

**Die Wirkung von Serumentzug
und Gabe von Nerve Growth Factor auf
humane Astrozytomzellen in Kultur**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Becker

geboren am 13. Mai 1978 in Arnstadt

Gutachter:

1: Prof. Dr. Patt, Jena

2: Prof. Dr. Jirikowski, Jena

3: Prof. Dr. Weis, Bern

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.Juni.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Wirkungen	8
1.1.1 Struktur der Neurotrophine	8
1.1.2 Neurotrophinrezeptoren	8
1.2 Die Wirkung von NGF auf Glia und Gliome	10
1.2.1 NGF und dessen Rezeptoren bei Astrozyten	10
1.2.2 NGF-Produktion und -Rezeptoren bei Gliomen	11
1.2.3 Der Einfluss von NGF auf die Proliferation und Apoptose in Gliomen.....	12
1.2.4 Der Einfluss von NGF auf Zellmorphologie, Differenzierung und Malignität von Gliomen	14
1.2.5 Autokrine Schleifen und Gliome	15
1.3 Kaliumkanäle	16
1.3.1 Einteilung und Aufbau von Kaliumkanälen	17
1.3.2 Die Rolle von Kaliumkanälen bei Proliferation und Differenzierung	18
1.3.3 Kaliumkanäle und Glia	20
1.3.4 Kaliumkanäle und Gliome	21
2 Fragestellungen und Ziele der Arbeit.....	23
3 Material und Methoden	25
3.1 Zellkultur	25
3.1.1 Zellen	25
3.1.2 Versuchsansätze und Medien.....	25
3.2 Immunzytochemische Markierungen	27
3.2.1 Nachweis des Ki67 Antigens	28
3.2.2 Nachweis der NGF-Rezeptoren trkA und p75	29
3.2.3 Nachweis der Kaliumkanäle Kv1.3 und TASK.....	30

3.3	Cerebelläre Körnerzellkulturen	30
3.4	TUNEL-Reaktion	32
3.5	Bewertung.....	34
4	Ergebnisse	37
4.1	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Zellmorphologie	37
4.2	Einfluss der Serumdeprivation auf die Neurotrophinrezeptoren trkA und p75.....	40
4.2.1	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die trkA-Expression	40
4.2.2	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die p75-Expression	41
4.3	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Ki67-Markierung	44
4.4	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die TUNEL-Markierung ...	48
4.5	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Kaliumkanäle Kv1.3 und TASK.....	52
4.5.1	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Kv1.3-Expression.....	52
4.5.2	Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die TASK-Expression.....	54
5	Diskussion	57
5.1	Neuronenähnliche Differenzierung der 1321N1-Zellen.....	57
5.1.1	Serumentzug als autokrine Stimulation	57
5.1.2	Serumentzug und zusätzliche NGF-Gabe.....	59
5.1.3	NGF-Rezeptoren auf 1321N1-Zellen	60
5.2	Wie verändern sich andere tumorbiologische Parameter unter Serumentzug ohne und mit NGF-Gabe?	63
5.2.1	Proliferation der 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation ohne und mit NGF	63
5.2.2	Apoptoserate der 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation ohne und mit NGF.....	65
5.2.3	Expression von Kv1.3 und TASK	68

5.3	Bedeutung der Ergebnisse	71
5.3.1	Besitzen endogen produzierte Wachstumsfaktoren eine Relevanz für wichtige tumorbiologische Parameter in Gliomzellen?	71
5.3.2	Lassen sich die in vitro gewonnen Erkenntnisse auf die Situation in vivo übertragen?	72
5.3.3	Ist die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf alle Gliome gleich?	73
5.4	Schlussfolgerungen	73
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Anhang	96
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BK _{Ca}	Big Conductance Ca ²⁺ activated K ⁺ channel
CNPase	2', 3' - Cyclic Nucleotide 3' - Phosphodiesterase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagl's Medium
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
Eag Kanäle	Ether a go go K ⁺ Kanäle
EGF	Epidermal Growth Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
IRK1	Inward Rectifier K ⁺ channel 1
K _{DR}	delayed rectifier K ⁺ channel
Kir	inward rectifier K ⁺ channel
KQT	Long QT syndrome associated K ⁺ channel
Kv	voltage gated K ⁺ channel
NGF	Nerve Growth Factor
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NT3	Neurotrophin 3
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKC	Proteinkinase C
PPF	Propentofylline
TASK	Tandem Pore Domain Acid Sensitive K ⁺ channel
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
TNF	Tumor Necrosis Factor
Trk (A / B / C)	Tropomyosin Rezeptor Kinase (A / B / C)
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TWIK	Tandem Pore Domain Weak Inward Rectifier K ⁺ Channel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Beispiel zum Auswertungsschema	34
Abb. 2:	Beispiele für die Morphologiegruppen.....	36
Abb. 3:	Zellmorphologie während der Serumdeprivation.....	37
Abb. 4:	Anti-trkA-markierte 1321N1-Zellen	39
Abb. 5:	Mittlerer Anteil p75-positiver Zellen in den Morphologiegruppen.....	40
Abb. 6:	1321N1-Zellen nach Markierung mit Anti-p75-Antikörpern.....	41
Abb. 7:	Häufigkeit p75-positiver Zellen während der Serumdeprivation	42
Abb. 8:	Mittlerer Anteil Ki67-positiver Zellen in den Morphologiegruppen.....	44
Abb. 9:	Ki67-markierte 1321N1-Zellen unter Serumentzug.....	45
Abb. 10:	Häufigkeit Ki67-positiver Zellen während der Serumdeprivation	46
Abb. 11:	TUNEL-markierte 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation	48
Abb. 12:	Mittlerer Anteil TUNEL-positiver Zellen in den Morphologiegruppen	49
Abb. 13:	Häufigkeit TUNEL-positiver Zellen während der Serumdeprivation.....	50
Abb. 14:	Anti-Kv1.3- und Anti-Ki67-markierte 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation	52
Abb. 15:	Anti-TASK-markierte cerebelläre Körnerzellkulturen der Ratte	54
Abb. 16:	Anti-TASK-markierte Glia- und 1321N1-Zellen	55

1 Einleitung

Um das Tumorwachstum und die hierfür bedeutsamen Faktoren besser verstehen und beeinflussen zu können, benutzt man häufig Zellkultursysteme. Hierbei ist bekannt, dass durch Veränderung der Kulturbedingungen die Tumorzelldifferenzierung entscheidend verändert werden kann. Beeinflusst wird dies durch Wachstumsfaktoren, die entweder von den Zellen selbst produziert oder von extern zugeführt werden. Dieses Phänomen ist bei neuronalen (Neuroblastomzellen) und neuroendokrinen (Phäochromozytomzelllinie PC12) Zellen schon gut untersucht (Greene und Tischler 1976 und 1982; Matsushima und Bogenmann 1993; Poluha et al. 1995; Bogenmann et al. 1998). Die Gabe von NGF induziert hier eine neuronale Differenzierung.

Ob eine Potenz zur Differenzierung auch bei Gliomzellen besteht, ist noch wenig untersucht. Einzelhinweise wurden an der Rattengliomzelllinie C6 und der humanen Gliomzelllinie U251 gefunden (Kokunai et al. 1999; Pflug et al. 2001). In früheren Ergebnissen unserer und anderer Arbeitsgruppen wurde eine Natriumkanalexpression in Gliomen elektrophysiologisch nachgewiesen (Patt et al. 1996; Ullrich et al. 1998; Kraft et al. 2001). Diese Eigenschaft könnte eine neuronähnliche Differenzierungspotenz der Gliomzellen anzeigen. Die Ausstattung der Tumorzellen mit funktionellen Natriumkanälen geht bei Langzeitkultivierung jedoch verloren, kann aber durch Serumentzug und Gabe von NGF wieder aktiviert werden, wie Kraft et al. (2001) an den humanen Astrozytomzelllinien 1321N1 und A172 zeigen konnten. Wachstumsfaktoren, Ionenkanäle und zelluläre Prozesse sind also eng miteinander verknüpft.

Um den Einfluss der Wachstumsfaktorproduktion auf Gliomzellen in vitro zu untersuchen, führten wir zur autokrinen Wachstumsfaktorstimulierung einen Serumentzug isoliert und in Kombination mit einer NGF-Gabe durch. Zur Charakterisierung des Einflusses der Wachstumsfaktoren wurden die Parameter: Proliferation, Apoptose, Morphologie und Kaliumkanalexpression untersucht. Da für die Wirkungsvermittlung von Wachstumsfaktoren die Expression der entsprechenden Rezeptoren auf den Tumorzellen zu vermuten ist, führten wir den Nachweis der für NGF wichtigen Neurotrophinrezeptoren durch.

Ziel der Arbeit ist es, das Wirkpotential von endogen produzierten und exogen zugegebenen Wachstumsfaktoren auf Gliomzellen vor dem Hintergrund einer möglichen therapeutischen Relevanz abzuschätzen.

1.1 Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Wirkungen

Wachstumsfaktoren sind eine Reihe unterschiedlich aufgebauter Moleküle, welche vielfältige biologische Vorgänge in Zellen beeinflussen können. Sie sind wichtig für die Kommunikation zwischen Zellen während der Entwicklung und normalen Organfunktion (Westphal und Herrmann 1989). Eingeteilt werden können sie unter anderem nach ihrer Wirkung (Apoptoseinduktion oder -hemmung), den produzierenden Zellen und dem Zielgewebe (Immunsystem, Nervensystem) sowie der Wirkungsweise (autokrin, parakrin, endokrin). So lässt sich eine Gruppe von Faktoren isolieren, denen eine immense Bedeutung in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems zukommt. Da zuerst ihre überlebensfördernde Wirkung auf bestimmte Neuronenpopulationen erkannt wurde, heißen sie Neurotrophine (Übersichtsartikel: Hamburger 1993; Korsching 1993; Snider 1994; Cowan et al. 1997; Bibel und Barde 2000).

Derzeit umfasst die Neurotrophinfamilie sechs Faktoren, unter ihnen das in unserer Arbeit untersuchte Neurotrophin 1 (= Nerve Growth Factor = NGF). Die folgenden einleitenden Kapitel sind deshalb NGF und seinen Rezeptoren gewidmet.

1.1.1 Struktur der Neurotrophine

Die reifen Proteine sind nicht kovalent verbundene Homodimere, wobei jedes Monomer drei Disulfidbrücken aufweist. Zwischen den einzelnen Neurotrophinen besteht eine hohe Strukturhomologie (50% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von NGF und BDNF) als Ausdruck ihrer engen Verwandtschaft. Das NGF-Gen ist hoch konserviert (Bibel und Barde 2000).

1.1.2 Neurotrophinrezeptoren

Alle bekannten Wachstumsfaktoren der NGF Familie binden an zwei verschiedene Rezeptortypen, die *trk*-Tyrosinkinaserzeptoren und den *p75*-Rezeptor (Chao 1992; Bothwell 1995).

Es wurden drei **trk-Rezeptortypen** identifiziert, welche durch ein oder mehrere Neurotrophine aktiviert werden können. Jedem Neurotrophin kann aber ein *trk*-Rezeptor

zugeordnet werden, an den es mit relativ hoher Affinität bevorzugt bindet und ihn am stärksten aktiviert. NGF bindet beispielsweise bevorzugt an den trkA-Rezeptor.

Während der Entwicklung des peripheren Nervensystems kann man als Hauptwirkung der Wachstumsfaktorbindung an trk-Rezeptoren die Verhinderung des programmierten neuronalen Zelltodes erkennen (Kaplan und Miller 1997).

In diesem Zusammenhang lässt sich die **Neurotrophinabhängigkeit** der Spinalganglienneurone während der Fetal- und Neugeborenenperiode erklären: Es überleben nur diejenigen Spinalganglienneurone, welche mit ihren Axonen Kontakt zu den Zielzellen gefunden haben und ausreichend mit den nur begrenzt vorhandenen Neurotrophinen versorgt werden (Barbacid 1994; Snider 1994).

Die Prozesse der Entwicklung des peripheren Nervensystems werden auch durch den **p75-Neurotrophinrezeptor** beeinflusst, welcher zur Familie der TNF-Rezeptoren (TNF = Tumor Nekrose Faktor) gehört. Er bindet mit niedriger Spezifität und Affinität alle bekannten Neurotrophine. Durch alternatives Splicen können (zumindest bei der Maus) zwei Isoformen des p75-Rezeptors entstehen. Eine komplette Form mit allen Proteindomänen und eine Form, ohne die extrazelluläre ligandenbindende Domäne (von Schack et al. 2001). Anfangs wurde diesem Rezeptor nur eine die trk-Rezeptoreffekte modulierende Wirkung zugeschrieben (Chao und Hempstead 1995). Da aber auch trk-unabhängige Effekte gefunden wurden, unterscheidet man zunehmend zwischen trk-abhängigen und trk-unabhängigen Wirkungen des p75-Neurotrophinrezeptors (Bredesen und Rabizadeh 1997; Barker 1998).

Als **trk-abhängige Wirkung** beeinflusst p75 zum einen das Ligandenprofil der trk-Rezeptoren (Bibel et al. 1999). Zum anderen wird durch den p75-Neurotrophinrezeptor die Tyrosinphosphorylierung der trk-Rezeptoren in der Gegenwart von entsprechenden Liganden gesteigert (Verdi et al. 1994). Teilweise erklärt dies die Steigerung der Neurotrophinwirkung bei Koexpression von trk- und p75-Rezeptoren gegenüber der alleinigen Wirkungsvermittlung durch trk. Andere Erklärungsversuche für diese gleichsinnigen, sich verstärkenden Wirkungen von trk- und p75-Rezeptoren setzen bei der gegenseitigen Beeinflussung der Rezeptoraffinität bzw. Ligandenbindung an. So soll p75 die Bindung von NGF an trkA und die anschließende Rezeptordimerisierung beschleunigen (Bothwell 1995). Entscheidend für die eintretende Wirkung der Neurotrophine ist auch das numerische Verhältnis der Rezeptoren zueinander

(Kaplan und Miller 1997). Eine maximale Wirkung der Neurotrophine entsteht nur, wenn beide Rezeptortypen an den Zielzellen vorhanden sind (Bredesen und Rabizadeh 1997). Weitere Interaktionsmöglichkeiten bestehen in der Ligandenpräsentation, Ligandenkonzentration und Konformationsänderungen.

Es gibt aber nicht nur Anhaltspunkte für antagonistische Interaktionen von p75- und trk-Rezeptoren. P75 kann zum Beispiel über den Sphingomyelinase-Ceramid-Weg die NGF / trkA-Wirkungen hemmen (Mac Phee und Barker 1997).

Zu einer der wichtigsten **trk-unabhängigen Wirkungen** des p75-Neurotrophinrezeptors zählt die Apoptoseinduktion. Einige Arbeiten berichten von einer ligandenabhängigen Induktion des natürlichen Zelltodes. Das heißt, NGF, als ein Ligand für p75, steigert die Apoptoserate in p75-exprimierenden Zellen (Casaccia-Bonofil et al. 1996; Frade et al. 1996; Bredesen et al. 1998). Dem entgegen steht eine Reihe von Berichten über die ligandenunabhängige Apoptoseinduktion. Hierbei bewirkt die alleinige Expression von p75 schon eine Steigerung der Apoptoserate, die durch Behandlung mit NGF gesenkt werden kann (Rabizadeh et al. 1993; Rabizadeh et al. 1999; Wang et al. 2000; De Freitas et al. 2001; Khursigara et al. 2001). In diesem Zusammenhang ist die „Todesdomäne“ im intrazellulären Anteil des p75-Neurotrophinrezeptors wichtig (Liepinsh et al. 1997; Yoon et al. 1998; Coulson et al. 2000).

1.2 Die Wirkung von NGF auf Glia und Gliome

1.2.1 NGF und dessen Rezeptoren bei Astrozyten

In Läsionen des basalen Großhirns der Ratte konnte bei der Umwandlung der ruhenden Astrozyten in reaktive, proliferierende Astrozyten eine zunehmende **Produktion von NGF** in diesen Zellen nachgewiesen werden (Roßner et al. 1997). Aber auch in Kultur weisen die sich sehr rasch teilenden Astrozyten einen gegenüber ruhender Glia sehr hohen NGF-mRNA-Gehalt auf (Lu et al. 1991).

In Astrozyten des Rattengroßhirns werden aber nicht nur Neurotrophine produziert, sondern auch **Neurotrophinrezeptoren** exprimiert. Hierbei handelt es sich größtenteils um p75- und bestimmte trkB/C-Rezeptorisofomen (Rudge et al. 1994). Hutton und Mitarbeiter (1992 und 1995) fanden eine Steigerung der p75-Neurotrophinrezeptor-Expression bei Gabe von NGF auf Astrozytenkulturen von adulten und neonatalen

Rattenhirnen. Es war auch ein Einfluss auf die Morphologie zu erkennen. NGF induzierte bei diesen Versuchen ein fibrozytäres Aussehen der Astrozyten in Kultur. In anderen Untersuchungen hatte NGF allerdings keine Wirkung auf die Astrozyten (Rudge et al. 1994). Aus diesem Grund ist es interessant zu untersuchen, ob und wie Gliomzellen durch NGF beeinflusst werden.

1.2.2 NGF-Produktion und -Rezeptoren bei Gliomen

In Gliomen wurde bisher eine Vielzahl von **Wachstumsfaktoren** gefunden (Prior et al. 1989; Westphal und Herrmann 1989; Reifenberger et al. 1991; Cheng et al. 1994). Hierzu zählen auch Faktoren der Neurotrophinfamilie (Hamel et al. 1993; Washiyama et al. 1996; Kokunai et al. 1999). Hamel et al. (1993) sahen die Neurotrophinsekretion sogar als typische Eigenschaft von Astrozytomen, da er in fast allen von ihm untersuchten Zelllinien NGF, NT3 oder BDNF nachweisen konnte. Diese Neurotrophinproduktion besteht wahrscheinlich nicht nur in vitro, sondern auch in vivo (Tornatore et al. 1997). Für die in unseren Versuchen verwendete humane Astrozytomzelllinie 1321N1 ist die Sekretion von NGF und weiteren, teils unbekannten neurotrophen Faktoren nachgewiesen (Obara et al. 1998 und 1999a). Zu weiteren etablierten Gliomzelllinien, für welche die Produktion von NGF nachgewiesen ist, gehören C6 Ratten-Gliomzellen (Murphy et al. 1977) und A172-Zellen (Hamel et al 1993).

Durch bestimmte Kulturbedingungen lässt sich bei einigen Tumoren die Produktion von NGF steigern (Obara et al. 1999a und 1999b). An der Phäochromozytomzelllinie PC12 ist dieses Phänomen gut untersucht. Durch Einwirkung bestimmter Substanzen, aber auch durch serumfreies Kulturmedium, lässt sich die NGF-Synthese in diesen Zellen stimulieren (Gill et al. 1998; Kumano et al. 2000). Auch Neurotrophine selbst können die Produktion anderer Neurotrophine steigern (Krüttgen et al. 1998). Bei drei Glioblastomzelllinien konnte eine ähnliche Steigerung der NGF-Produktion durch Serumentzug nachgewiesen werden (Singer et al. 1999). Das könnte im Zusammenhang mit der stressinduzierten NGF-Produktion, wie sie in reaktiven Astrozyten bei Entzündungen oder nach Rhizotomie beobachtet werden kann, stehen (Lu et al. 1991).

Aus diesem Grund und weil Serum selbst Wachstumsfaktoren sowie Substanzen enthält, welche deren Effekte modulieren (Lee und Koo 1999), wurde in unseren Versuchen serumfreies Medium verwendet.

Neben der Produktion von Wachstumsfaktoren zeigen Gliome auch die Expression der entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptoren (Watanabe et al. 1999). Man konnte deshalb bei Gliomen in hohem Maße **Neurotrophinrezeptoren** nachweisen, was auf eine bedeutsame Rolle dieser Rezeptoren für tumorassoziierte Vorgänge hindeutet. So ließen sich in einer immunhistochemischen Untersuchung an kindlichen Gliomen bei einem hohen Prozentsatz der Gliome trkB-Rezeptoren, weniger häufig auch trkA- und p75-Rezeptoren nachweisen (Kato et al. 1995; Washiyama et al. 1996). Untersuchungen von Wang et al. (1998) bestätigten eine deutliche Trk-Rezeptorimmunoreaktivität in nativem humanen Gliommaterial, weisen aber auch auf einen Verlust derselben bei Langzeitkultivierung der Gliomzellen hin. Wahrscheinlich fand aus diesem Grund Hamel et al. (1993) in den von ihm untersuchten humanen Gliomzelllinien keine Neurotrophinrezeptoren. In anderen Glioblastomzelllinien konnten jedoch mittels Westernblot sowohl trk- als auch p75-Rezeptoren nachgewiesen werden (Hutton et al. 1992; Singer et al. 1999). Sogar eine verstärkte p75-Neurotrophinrezeptor-Expression bei Stimulierung mit Neurotrophinen ist erkennbar (Hutton et al. 1992; Spoorri et al. 1992). Ob eine derartige Steigerung der Neurotrophinrezeptorexpression auch unter autokriner Stimulation durch Serumentzug bei der 1321N1-Zelllinie vorkommt, ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Aus dieser großen Schwankungsbreite der Rezeptorexpression erklärt sich eine relativ große Variabilität der Wirkungen von Wachstumsfaktoren, speziell den Neurotrophinen auf Gliomzellen. Sie unterscheiden sich bei Gliomen von Primärtumor zu Primärtumor und von Zelllinie zu Zelllinie (Vinores und Köstner 1980; Cheng et al. 1994). In den folgenden Abschnitten sollen einzelne Effekte von Neurotrophinen und anderen Wachstumsfaktoren, insbesondere von NGF, auf Gliome näher besprochen werden.

1.2.3 Der Einfluss von NGF auf die Proliferation und Apoptose in Gliomen

Da Wachstumsfaktoren eine Therapieoption von Malignomen darstellen könnten, ist deren Einfluss auf die mitotische Aktivität von Astrozytomzellen häufig untersucht worden (Vinores und Köstner 1980; Marushige et al. 1992; Engebraaten et al. 1993; Sakuma et al. 1993; Cheng et al. 1994; Dobrowsky et al. 1994; Tanaka et al. 1998; Singer et al. 1999; Watanabe et al. 1999). Leider finden sich jedoch nur sehr inkonstante Ergebnisse. Ein

Schlüssel zum besseren Verständnis dieser Effekte ist die Analyse der Wirkungsvermittlung an den Zellen, also den Rezeptoren und der an sie anschließenden Signaltransduktionskaskaden (Baltuch und Yong 1996). Um die teils entgegengesetzten Wirkungen von NGF besser darstellen zu können, wird im folgenden versucht, zwischen trkA- und p75-vermittelten Wirkungen zu unterscheiden:

Oft wird durch aktivierte **trkA-Rezeptoren** ein das **Zellwachstum hemmendes** Signal erzeugt. Dies ist nicht nur in vitro (Marushige et al. 1992; Kokunai et al. 1999; Pflug et al. 2001), sondern auch in vivo möglich (Lachyankar et al. 1997; Rabin et al. 1998) und geht dann mit einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase einher (Marushige et al. 1992; Kokunai et al. 1999). Die Hemmung der Proliferation tritt in diesem Fall nicht mit einer gesteigerten Apoptoserate auf (Pflug et al. 2001).

Interessant ist dabei, dass oft die trkA Transfektion und Expression in Zellen, die vorher keinen trkA-Rezeptor besaßen, schon alleine die Proliferation effektiv senken kann (Kokunai et al. 1999). Da exogen zugeführtes NGF diesen Effekt noch verstärken kann, könnte man dies als ein Zeichen der endogenen Neurotrophinproduktion werten und die Frage nach autokrinen Regulationsmechanismen (Absatz 1.2.5) der Zellteilungsrate stellen.

Teilweise ist der proliferationshemmende Effekt von NGF auf Gliome aber nur von kurzer Dauer. Viores und Köstner (1980) interpretierten dies als ein Hinweis auf eine mögliche Heterogenität der Gliomzellen in Bezug auf die Neurotrophinrezeptorexpression. Nicht NGF-empfindliche Zellen überstanden die Wachstumsfaktorbehandlung und solche mit NGF-Sensitivität waren nach kurzer Zeit abgestorben. Diese Heterogenität der Gliomzellen sollte bei der Untersuchung von Wachstumsfaktoren und Gliomen beachtet werden.

Andererseits existieren einige Arbeiten, die über eine **Proliferationssteigerung** im Zusammenhang mit trkA-Rezeptoren berichten (Engebraaten et al. 1993; Colangelo et al. 1994; Yoon et al. 1998; Singer et al. 1999). Hierzu muss allerdings bemerkt werden, dass in diesen Zellen nicht nur der trkA-Neurotrophinrezeptor exprimiert wurde, sondern auch gleichzeitig der p75-Rezeptor vorhanden war. Unter dieser Konstellation soll das zahlenmäßige Verhältnis der Neurotrophinrezeptoren untereinander entscheidend für die Wirkung des gemeinsamen Agonisten sein (Bredesen und Rabizadeh 1997, Kaplan und Miller 1997). Bei diesen Versuchen wurde auch eine Heterogenität der Zellen erkannt. So fanden Singer et al. (1999) unter NGF-Einwirkung auf die von ihnen untersuchten

Gliomzelllinien langsam und schnell proliferierende Zellen nebeneinander. Ob sich diese Zellen auch in der Zusammensetzung ihrer Neurotrophinrezeptoren unterscheiden, wurde nicht näher untersucht. Immunzytochemische Markierungen der einzelnen Neurotrophinrezeptoren, wie von uns durchgeführt, sollen darüber Auskunft geben.

Gliomzellen, die nur den **p75-Neurotrophinrezeptor** exprimieren, können gegenüber NGF resistent sein und zeigen dann keine Änderung der Proliferations- oder Apoptoserate bei NGF-Behandlung (Hamel et al. 1993; Colangelo et al. 1994; Pflug et al. 2001). Durch NGF und p75 vermittelte Proliferationshemmung (Dobrowsky et al. 1994) und eine mit dieser Signaltransduktionskaskade wahrscheinlich assoziierte Apoptoseinduktion (Yamaguchi et al. 1998) konnten ebenfalls beobachtet werden. Arbeiten über eine sicher neurotrophinentzugsinduzierte, p75 assoziierte Apoptoseinduktion (siehe Absatz 1.1.2 oder Rabizadeh et al. 1993 und 1999; Wang et al. 2000; De Freitas et al. 2001; Khursigara et al. 2001) liegen an glialen Tumoren bisher nicht vor.

1.2.4 Der Einfluss von NGF auf Zellmorphologie, Differenzierung und Malignität von Gliomen

Den proliferationshemmenden Effekt von NGF auf einige Tumorzelllinien kann man zum Teil durch das Einsetzen einer **neurotrophininduzierten Differenzierung** der Tumorzellen erklären (Pflug et al. 2001). Ein gut untersuchtes Zellkulturmodell zur Differenzierungsinduktion durch Neurotrophine sind PC12-Phäochromozytomzellen (Greene und Tischler 1982). Durch 1321N1-Zellen konditioniertes Medium lässt hierbei die typischen Veränderungen der PC12-Zellen entstehen, welche für die neuronale Differenzierung dieser Zellen sprechen: **Fortsatzwachstum**, Mitosestop u.a. (Obara et al. 1998).

Die Wirkung der von den 1321N1-Zellen produzierten Wachstumsfaktoren auf die 1321N1-Zellen selbst wurde erstmals von Kraft et al. (2001) während längerer Kultivierung in serumfreiem Medium untersucht. Hierbei wurde eine deutliche Veränderung der Zellformen über die Zeit des Serumentzuges festgestellt:

Zuerst wurde den Zellen während 24 Stunden in serumhaltigen Medium das Anwachsen an die Oberfläche des Kulturbedältnisses ermöglicht. So entwickelte sich eine fibroblastenähnliche Morphologie der meisten Zellen. Unter Serumentzug zeigten sie binnen neun Tagen kompaktere, abgerundete Zellsomata mit längeren Fortsätzen. Dieser

Prozess konnte durch exogen zugeführtes NGF (100ng/ml) beschleunigt und ausgeprägter beobachtet werden.

Ähnliche Veränderungen, insbesondere das Entstehen von längeren Fortsätzen, konnten auch an anderen glialen Zelllinien gefunden werden. Dieser Effekt kann sowohl trkA- als auch p75-vermittelt sein (Vinores und Köstner 1980; Colangelo et al. 1994; Dobrowsky et al. 1994; Kokunai et al. 1999; Watanabe et al. 1999; Pflug et al. 2001). Diese Eigenschaft könnten diese tumorösen Zellen noch von ihren benignen Vorläufern, z.B. den Astrozyten, beibehalten haben (Hutton und Perez Polo 1995). Das Fortsatzwachstum gilt als ein relativ einfach zu erfassender Marker von zellulären Differenzierungsprozessen (Phung et al. 1999) und wurde deshalb in unsere Beobachtungen einbezogen.

Bisher ist nicht geklärt, welche Gliome mit einer Differenzierung auf Neurotrophine reagieren. Vinores und Köstner (1980) zeigten, dass nur relativ undifferenzierte, also maligne Gliome eine **Neurotrophinempfindlichkeit** zeigten. Da die Zelllinie 1321N1 ein malignes Astrozytom humanen Ursprungs ist, sollte eine Sensibilität der Zellen in unseren Versuchen gegeben sein.

Die Wirkung der Neurotrophine und deren Rezeptoren auf die **Malignität** von Gliomen lässt sich bei in vivo-Versuchen erkennen:

Bei Tumorimplantationsversuchen an Nagern wurde festgestellt, dass trkA-transfizierte Gliomzellen wesentlich kleinere Tumormassen als Kontrollzellen nach gleicher Beobachtungszeit hervorbringen (Rabin et al. 1998). Bei Kokunai et al. (1999) waren die trkA-exprimierenden Zellen sogar unfähig, in den Versuchstieren anzuwachsen.

Diese Beobachtungen in vivo widersprechen jedoch teilweise den bereits besprochenen Wirkungen in vitro. NGF-induzierte Proliferations- (Absatz 1.2.1) und Invasivitätssteigerungen (Engebraaten et al. 1993) sollten in vivo nämlich eine Steigerung der Malignität bedeuten.

1.2.5 Autokrine Schleifen und Gliome

Die gleichzeitige Expression von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren bzw. die daraus bestehenden autokrinen Regulationskreise sind bei einigen Tumoren die Basis für das unabhängige Wachstum (Westphal und Herrmann 1989). So spricht die in Astrozytomen und Glioblastomen auftretende häufige simultane Expression von BDNF

sowie von CNTF mit ihren adäquaten Rezeptoren für derartige Mechanismen bei Gliomen (Tajima et al. 1998; Weis et al. 1999). Speziell an der C6-Rattengliomzelllinie wurden Hinweise auf eine auto- / parakrine Wirkung von NGF gefunden: Watanabe et al. (1999) schalteten die endogene NGF-Aktivität mittels Anti-NGF-Antikörpern aus. Danach beobachteten sie einen starken und schnellen Rückgang der Zellzahl, Zellatrophie mit Verlust von Wachstumskegeln und Dilatation der Fortsätze. Auch hat NGF bei diesen Zellen einen Effekt auf die Rezeptorexpression. Mit und ohne exogen zugeführtem NGF sind rund 80% NGF-rezeptorpositive Zellen mit immunzytochemischen Methoden zu markieren. Dieser Anteil sinkt bei anti-NGF-Antikörperzugabe schnell auf unter 10%. Es existieren also Rückkopplungsmechanismen in diesem autokrinen „Regulationskreis“.

Ähnliche Befunde zeigen auch Versuche mit dem Tyrosinkinaseinhibitor K252 an anderen glialen Zelllinien. Er blockiert die durch trkA ausgelöste intrazelluläre Signaltransduktion und hemmt ebenfalls die Proliferation von Glioblastomen (Singer et al. 1999).

Trotz dieser augenscheinlichen Relevanz solcher autokrinen Regulationsmechanismen sollte man sich vergegenwärtigen, dass die Gliomzellen in Kultur über mehrere Passagen ihre trkA-Neurotrophinrezeptoren verlieren, die Fähigkeit des autonomen Wachstums aber behalten (Wang et al. 1998).

Weil NGF in der 1321N1-Zelllinie schon nachgewiesen wurde (Obara et al. 1998), kann eine autokrine Schleife über NGF und die zugehörigen NGF-Rezeptoren vermutet werden. Um diesen Sachverhalt genauer zu betrachten, wurden in der vorliegenden Arbeit stets Zellen unter Serumdeprivation allein und unter Serumdeprivation mit zusätzlicher exogener Zufuhr von NGF verglichen. Da für die Wirkung von Wachstumsfaktoren die entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptoren nötig sind, wurde mittels immunzytochemischer Methoden die Expression der NGF-Rezeptoren p75 und trkA untersucht.

1.3 Kaliumkanäle

Kaliumkanälen kommt eine große Bedeutung in tumorbiologischen Prozessen zu. Wegen ihrer relevanten Beziehung zu Proliferation und Differenzierung wurden zwei Kanäle aus dieser sehr umfangreichen Gruppe untersucht (Dubois und Rouzaire-Dubois 1993; Nilius

und Droogmans 1994; Brismar 1995; Wonderlin und Strobl 1996; Pardo et al. 1999). Wegen des großen Umfangs dieses Themas soll ihm ein eigenes einleitendes Kapitel gewidmet werden.

1.3.1 Einteilung und Aufbau von Kaliumkanälen

Es werden drei Hauptgruppen an der Anzahl der transmembranären Domänen sowie der Zahl der Ionenporen pro Kanalprotein unterschieden. So gibt es Kanäle mit zwei, vier und mit sechs solcher Domänen. Die erste Gruppe mit zwei transmembranären Domänen besteht hauptsächlich aus den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen. Die Gruppe mit sechs transmembranären Domänen kann weiter unterteilt werden in die Familien der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv), die KQT Kanäle, Eag Kaliumkanäle und die Gruppe der calciumaktivierten Kaliumkanäle (z.B.: BK_{Ca}). Diese beiden Gruppen stellen Einporenkanäle dar.

Eine relativ neue Klasse von Kaliumkanälen sind die sog. Hintergrund-Kaliumkanäle mit 4 transmembranären Domänen und zwei Porenregionen (auch Zwei-Poren-Kaliumkanäle oder tandem pore domain potassium channels, Kim et al. 1998). Hierzu zählt unter anderem TASK. Er besteht aus Untereinheiten mit jeweils vier transmembranären Domänen (Reyes et al. 1998; Arrighi et al. 1998; Coetzee et al. 1999; Maingret et al. 1999).

Im folgenden sollen nur die in der vorliegenden Studie untersuchten Kaliumkanäle näher beschrieben werden. Die Auswahl der genutzten Antikörper wurde sehr stark durch deren Verfügbarkeit eingeschränkt. Die Anzahl der untersuchten Kanäle war daher sehr gering.

Kv1.3 gehört in die Gruppe der Kv-Kanäle. Diese sind bei Ruhemembranpotential geschlossen und öffnen sich bei Depolarisation (Miller 1991; Grissmer et al. 1994).

Elektrophysiologisch lassen sich zwei Typen identifizieren. Die verzögernd-gleichrichtenden bzw. delayed-rectifier Kaliumkanäle (K_{DR}) und die A-Typ (K_A) unterscheiden sich in elektrophysiologischen Eigenschaften. Kv1.3 gehört der erstgenannten Gruppe an.

Kv-Kanäle bestehen aus vier porenbildenden α -Untereinheiten, welche mit je einer β -Untereinheit verbunden sind (Dolly und Parcej 1996). Es sind neun verschiedene α -Untereinheiten (Kv1 – Kv9) bekannt (Pongs et al. 1999). Durch die Bildung

heterooligomerer Proteine, die Möglichkeit der Assoziation mit verschiedenen β -Untereinheiten (3 verschiedene Gene sind bisher bekannt) und dem alternativen Splicen der mRNA (Levitan und Takimoto 1998) ist die Vielfalt an Kv-Kanälen jedoch wesentlich höher. Kv-Kanäle sind sehr wichtig für die normalen Erregungsabläufe im ZNS und werden dort in hohem Maße exprimiert (Coleman et al. 1999). Sie kommen aber auch in nicht erregbaren Zellen (z.B.: T-Lymphozyten und Glia) vor (siehe nächstes Kapitel).

Kv-Kanäle können phosphoryliert werden. Die Kv1.3-Kanalaktivität kann auf diese Weise durch aktivierte EGF-Rezeptoren kurzfristig deutlich reduziert werden (Holmes et al. 1996; Szabo et al. 1996; Fadool et al. 2000). Auf diese und ähnliche Weise können Ionenkanäle in die verschiedensten Signaltransduktionskaskaden eingebaut sein. Deshalb ist der Nachweis des Kanalproteins nicht gleichbedeutend mit dem Vorliegen des funktionsfähigen Kaliumkanals.

Der **TASK**-Kanal gehört zur Familie der Zwei-Poren-Kaliumkanäle (Kim et al. 1998). Diese Bezeichnung leitet sich aus ihren elektrophysiologischen Eigenschaften ab: Spannungsunabhängige, nicht inaktivierende Kaliumströme ohne Gleichrichtung („open rectifier“) kennzeichnen diesen Kanaltyp. Dieses Verhalten kann man mit einer kaliumselektiven Membranpore, welche ständig geöffnet ist, vergleichen. Deshalb wird dieser Kanal auch als „Leck-“ oder „Hintergrund-Kaliumkanal“ bezeichnet (Lopes et al. 2000). Seine Bedeutung liegt hauptsächlich in der Beeinflussung des Ruhemembranpotentials (Millar et al. 2000).

Trotzdem ist die Aktivität von TASK nicht ständig konstant. Er wird durch Schwankungen des extra- und intrazellulären pH sowie bestimmte Neurotransmitter beeinflusst (Gray 2000; Talley et al. 2000; Karschin 2001).

Das für TASK kodierende Gen wird nicht nur im ZNS, sondern ubiquitär exprimiert. So kommt TASK auch im Herz, Darm, Pankreas, in der Niere und der Prostata vor (Duprat et al. 1997).

1.3.2 Die Rolle von Kaliumkanälen bei Proliferation und Differenzierung

Schon länger ist ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von Kaliumkanälen und der **Proliferation** an verschiedenen Zellen bekannt. Anhaltspunkte lieferte die in vielen Zelllinien beobachtete Proliferationshemmung durch Kaliumkanalblocker (z.B.: Chiu und Wilson 1989; Allen et al. 1997; Attali et al. 1997; Rouzaine-Dubois et al. 1998

und 2000) sowie die Veränderung der Kaliumleitfähigkeiten während des Zellzyklus und nach Einwirkung von Mitogenen (Dubois und Rouzaire-Dubois 1993; Nilius und Droogmans 1994; Wonderlin und Strobl 1996). Es existieren verschiedene Erklärungsversuche. Einerseits sollen über Veränderungen der Kaliumleitfähigkeit die durch Nährstoffaufnahme verursachten Zellvolumenschwankungen ausgeglichen werden, andererseits scheint aber auch der Einfluss auf transmembranäre Transportvorgänge (Nährstoffe und Calcium) von Bedeutung zu sein (Nilius und Droogmans 1994; Wonderlin und Strobl 1996; Rouzaire-Dubois et al. 1998 und 2000).

Als Kardinalbeispiel für den Zusammenhang zwischen der Kaliumkanalaktivität und Proliferation werden meist T-Lymphozyten angeführt (Wonderlin und Strobl 1996). Kv1.3-Homomultimere und calciumaktivierte Kaliumkanäle sind bei diesen Zellen wahrscheinlich für die proliferationsassoziierte Hyperpolarisation verantwortlich und auch essentiell für die Überführung der ruhenden Zellen in den aktiven Zustand (Helms et al. 1997; Khanna et al. 1999; Jensen et al. 1999; Levite et al. 2000). Bei diesem Aktivierungsvorgang wird die Kv1.3-Offenwahrscheinlichkeit und damit die Kaliumleitfähigkeit der Membran maßgeblich durch die Proteinkinase C (PKC) heraufreguliert (Chung und Schlichter 1997). Auch beim Aktivierungsprozess der Mikroglia spielen Kv-Kanäle eine ähnlich wichtige Rolle (Schlichter et al. 1996; Jou et al. 1998; Kotecha und Schlichter 1999).

Die **Differenzierung** von unreifen Zellen in Zelltypen des adulten Organismus geht auch oft mit Veränderungen im elektrophysiologischen Phänotyp, das heißt also auch mit Veränderungen im Ionenkanalmuster einher (Ishiuchi et al. 1998, MacFarlane und Sontheimer 2000a und 2000b).

Bekannt ist, dass bei einigen Differenzierungsprozessen auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kv) herunter- und einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kir) heraufreguliert werden (Sobko et al. 1998, MacFarlane und Sontheimer 2000a und 2000b). Anhaltspunkte hierfür finden sich bei transformierten und nicht transformierten Zellen:

Beispiele für solche Prozesse während der Entwicklung erkannte man an Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, glialen Retinazellen und Schwannzellen (Konishi 1989; Attali et al. 1997; Ma et al. 1998; Pappas und Ritchie 1998; Arcangeli et al. 1999; MacFarlane und Sontheimer 2000b).

An malignen Zellen sind derartige Untersuchungen meist in vitro unter Differenzierungsfördernden Bedingungen vorgenommen worden. So kommt es beim Differenzierungsprozess einer bestimmten Leukämiezelllinie zu einem starken Rückgang der Kv1.3- und Anstieg der IRK1-mRNA (De Coursey et al. 1996).

Eine feste Regel, welche Kanäle nun für den proliferativen oder den differenzierten bzw. ruhenden Zustand sprechen, lässt sich allerdings nicht herausstellen. Dies ist von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich. Trotzdem kann man den elektrophysiologischen Phänotyp als Hinweis auf Richtung und Intensität einsetzender Differenzierungsprozesse werten (Ishiuchi et al. 1998). Typisch für derartige Vorgänge ist insbesondere die Hyperpolarisierung des Ruhemembranpotentials (Arcangeli et al. 1999).

Kaliumkanäle stehen auch in Zusammenhang mit der **Transformation** von normalen in neoplastische Zellen (Bordey und Sontheimer 1998a). So können bei diesem Vorgang neben einer Reihe von Oncogenen auch Kaliumkanäle angeschaltet werden (Wonderlin und Strobl 1996; Arcangeli et al. 1998; Bianchi et al. 1998; Cherubini et al. 2000). Wahrscheinlich verursachen einwärts gleichrichtende Kanäle eine für stark proliferierende Zellen typische Depolarisierung der Zellmembran (Bianchi et al. 1998).

1.3.3 Kaliumkanäle und Glia

In den glialen Zellen des zentralen Nervensystems wird eine Vielzahl von Ionenkanälen exprimiert. Diese sind im Zusammenspiel sehr wichtig für die Aufrechterhaltung der Kaliumhomöostase im zentralen Nervensystem (Sontheimer 1994; Newman et al. 1995). In diesem Zusammenhang sind zum Beispiel Kir- und Kv-Kanäle zu erwähnen (Sontheimer 1994).

Unter den Astrozyten existieren erhebliche Unterschiede in der Ionenkanalexpression. Dies ist zum Teil durch den regional unterschiedlichen Einfluss von umgebenden Zellen bedingt. Neurone beeinflussen so über direkten Zell-Zell-Kontakt und lösliche Wachstumsfaktoren die elektrophysiologischen Eigenschaften der Glia (Barres et al. 1990a; Sontheimer 1994; Oh 1997; Verma et al. 1997). Außerdem kann man Astrozyten mit einem eher neuronalen oder einem eher eingeschränkteren Ionenkanalmuster unterscheiden (Barres et al. 1990a). In der Kultur von Rattenastrozyten ist die Expression von Ionenkanälen in Kultur mit einer bestimmten Zellform verbunden (Emmi et al. 2000).

Diese Ströme bzw. Ionenkanäle werden in verschiedenen **Entwicklungs**phasen der Astrozyten nicht gleich stark exprimiert (McKhann et al. 1997; Brockhaus und Deitmer 2000). Astrozytentypische Kanäle lassen sich erst in reiferen Astrozyten finden (Barres et al. 1990b). Verzögernd gleichrichtende Kaliumströme scheinen allerdings bei differenzierten und undifferenzierten Astrozyten vorhanden zu sein (Barres et al. 1990a).

Wie in vielen anderen Zellen stehen die Kaliumkanäle der Gliazellen auch im Bezug zu deren **Proliferation** (Konishi 1989; Yager et al. 2001). Ruhende differenzierte Astrozyten sind wie oben erwähnt besonders durch Kir-Ströme charakterisiert (Bordey und Sontheimer 1997; Li et al. 2001). Reaktive, proliferierende Astrozyten sind hingegen durch prominente delayed rectifier Kaliumströme und reduzierte Kir-Ströme gekennzeichnet (MacFarlane et al. 1997; Koller et al. 1998; Perillan et al. 1999; MacFarlane und Sontheimer 2000b; Li et al. 2001). Typisch sind die durch Phosphorylierung aktivierten Kv1.5 (Roy et al. 1996; Schmidt et al. 1999; MacFarlane und Sontheimer 2000a). Die Blockade der für den proliferativen (bzw. differenzierten) Zustand typischen Kanäle, fördert das Übergehen der Zellen in den differenzierten (bzw. proliferativen) Zustand.

1.3.4 Kaliumkanäle und Gliome

Auch in Gliomen beeinflussen Kaliumkanäle eine Reihe von zellbiologischen Prozessen. So sind für die **Proliferation** von Gliomzellen die Kv-Kanäle von Bedeutung (Akhtar et al. 1999). Zwischen nicht transformierter und transformierter Glia- / Gliomzelle sind deutliche Unterschiede in der Expression dieser Ionenkanäle vorhanden (Akhtar et al. 1999). Auch das Ruhemembranpotential verändert sich (Brismar 1995).

In humanen Gliomzelllinien hemmen Kaliumkanalblocker die Proliferation (Chin et al. 1997). In der Signalübermittlung zwischen Kaliumkanal und Zellproliferation ist das Zellvolumen eine sehr wichtige Größe. Allgemein scheint zu gelten: eine sinkende Gliomzellproliferation (z.B. durch Kaliumkanalantagonisten) ist mit steigendem Zellvolumen verbunden (Rouzaine-Dubois et al. 2000).

Ein Zusammenhang von Kaliumkanälen mit zellbiologischen Vorgängen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung ist bei Gliomen noch wenig verstanden. Unsere Studie stellt einen Beitrag zum Verständnis des möglichen Zusammenhangs zwischen Wachstumsfaktoren und Kaliumkanälen in 1321N1-Gliomzellen dar.

Anhaltspunkte, für die Relevanz von Kaliumkanalsubfamilien lieferte die Arbeit von Kraft et al. (2001). Die Autoren beobachteten an 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation folgende elektrophysiologische Veränderungen an den differenzierten, runden Zellen mit Fortsätzen (nicht veröffentlicht): Passive Kaliumströme, das heißt Ströme mit einer linearen Strom-Spannungs-Beziehung, traten in der 1321N1-Zelllinie auf und verschwanden weitgehend bei Differenzierung unter Serumentzug. Weiterhin stellten sie einen parallel dazu auftretenden Anstieg der delayed rectifier-Kaliumströme und das Auftreten von spannungsabhängigen Natriumströmen fest.

Analog zu diesen elektrophysiologischen Daten soll hier die Expression von Ionenkanälen immunzytochemisch untersucht werden. Da keine passenden Natriumkanalantikörper und nur eine sehr eingeschränkte Auswahl von verfügbaren humanen Kaliumkanalantikörpern vorhanden war, begrenzten sich die Analysen auf den TASK- und Kv1.3-Kaliumkanal.

TASK gehört der Gruppe der Zwei-Poren-Kaliumkanäle an und könnte durchaus die Änderungen der passiven Ströme in 1321N1-Zellen mitverursachen. Er wurde in kultivierten Rattenastrozyten (Millar et al. 2000; Gnatenco et al. 2002) nachgewiesen. Über das Vorkommen von TASK an Gliomzellen existieren bisher noch keine Daten.

Repräsentativ für die delayed rectifier-Kaliumkanäle wählten wir Kv1.3 aus. Für ihn sind bereits einige Beziehungen zu Differenzierung und Proliferation beschrieben worden (siehe Kapitel 1.3.2). So ist er bei humanen T-Lymphozyten essentiell für deren Aktivierung und die damit einsetzende Proliferation (Helms et al. 1997; Khanna et al. 1999; Jensen et al. 1999; Levite et al. 2000). Besonders die Beobachtungen über den Anstieg von Kanälen dieser Familie bei der Induktion von Gliose und der damit einsetzenden starken Proliferation von Astrozyten machten ihn sehr interessant für unsere Untersuchungen (MacFarlane und Sontheimer 1997 und 2000b).

2 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren auf Tumorzellen unterschiedliche Wirkungen zeigen können. Sie können proliferationsfördernd wirken, aber auch eine Zelldifferenzierung und Wachstumshemmung bewirken. In glialen Zelllinien (u.a. in der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1) konnte elektrophysiologisch eine neuronenhähnliche Differenzierung nachgewiesen werden (Kraft et al. 2001): Nach Serumentzug, wodurch die Wachstumsfaktorproduktion der Gliomzellen angeregt wurde (autokrine Stimulation), und nach zusätzlicher Gabe von NGF konnte die Expression von spannungsgesteuerten Natriumkanälen induziert werden. Ferner zeigten sich veränderte passive und spannungsabhängige Kaliumströme. Nicht untersucht wurde bisher, welche Mechanismen, Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren dem zugrunde liegen und wie der Differenzierungsprozess durch die Parameter Proliferation und Apoptose näher beschrieben werden kann. Ebenso wurde nicht weiter untersucht, welche Kanalsubtypen die Veränderung der elektrophysiologischen Parameter verursachen. Die vorliegende Arbeit geht diesen Fragen im selben experimentellen Modell, wie es von Kraft et al. (2001) verwendet wurde, nach. Da für die immunzytochemische Analyse der Natriumkanalexpression keine Antikörper zu Verfügung standen, beschränkten wir uns auf die Untersuchung der Expression des proliferationsassoziierten Kaliumkanals Kv1.3 sowie des Zwei-Poren-Kaliumkanals TASK.

An der humanen Astrozytom-Zelllinie 1321N1 wurden nach Serumdeprivation ohne und mit NGF-Gabe folgende Parameter erfasst:

- Zellmorphologie
- Expression der NGF-Rezeptoren trkA und p75
- Proliferation (Ki67-Immunhistochemie)
- Apoptose (TUNEL-Methode)
- Expression der Kaliumkanäle Kv1.3 und TASK

Im einzelnen lassen sich folgende Fragen formulieren:

- 1) Lässt sich in den von uns durchgeführten Experimenten eine neuronenhähnliche Differenzierung unter Serumdeprivation durch Analyse der morphologischen Veränderungen bestätigen? Welchen Einfluss hat die Zufuhr von exogenem NGF auf diesen Vorgang?

- 2) Werden NGF-Rezeptoren als Voraussetzung der Wirkung von endogen gebildeten und exogen zugeführtem NGF exprimiert? Zu welchem Zeitpunkt und in welchen Zellen kommen sie vor?
- 3) Wie lässt sich der (Differenzierungs-) Prozess unter Serumentzug anhand anderer zellbiologischer Parameter beschreiben? Verändert sich die Proliferation, Apoptoserate, Kv1.3- und TASK-Expression? In welchem Verhältnis stehen diese Veränderungen zur Morphologie und NGF-Rezeptor-Expression?

Mit dieser Arbeit soll das Wirkpotential von endogen produzierten und von exogen zugegebenen Wachstumsfaktoren auf Gliomzellen abgeschätzt werden. Eine eventuell günstige Auswirkung auf die Tumorbiologie kann durch folgende Konstellation gekennzeichnet sein: Differenzierung der Zellen, Proliferationsrückgang und Apoptoseanstieg. Die Arbeit versucht zu klären, ob sich diese Konstellation in vitro abzeichnet.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellen

Die zwei verwendeten 1321N1-Zellchargen wurden von der European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, England) bezogen. Sie wurden in Kulturflaschen (50ml, 25cm², Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) in DMEM mit fötalem Kälberserum (10%ig, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) dauerkultiviert. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Steri-Cult 200, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO₂ gehalten. Die Versuche wurden unter sterilen Kautelen in einer Sterilkabine (Laminarbox 1920GV, VEB Elektromat Dresden, Deutschland) angesetzt.

3.1.2 Versuchsansätze und Medien

Die Zellen für Versuchsansätze wurden aus dicht gewachsenen Kulturflaschen der Passagen 2 - 25 wie folgt gewonnen: Zuerst wurde das Kulturmedium abgesaugt und 2%iges Trypsin (SERVA, Feinbiochemica Heidelberg, Heidelberg, Deutschland) in PBS bis zur beginnenden Ablösung der Zellen zugegeben. Nach Entfernen der Trypsinlösung und Abschlagen der Zellen konnten diese in etwa 5ml serumhaltiges Kulturmedium (DMEM komplett) aufgenommen werden. Erhielten wir hierbei keine Einzelzellen, wurden diese unter Zuhilfenahme eine 10ml Pipette (Sarstedt Serological Pipette, Nümbrecht, Deutschland) mechanisch dissoziiert.

Die Abschätzung der im Medium enthaltenen Zellen pro ml wurde in einer Fuchs Rosenthal Zählkammer vorgenommen. Anschließend wurde das zellhaltige Medium verdünnt (pro 0,5ml rund 20.000 Zellen) und in Spezialkammern (Lab-Tek Chamber slide system, 8 well, Nalge Nunc Int., Naperville, USA) gebracht. Insgesamt acht solche Kammern saßen auf einem Objektträger, welcher den Boden dieser Kammern bildete. Nach Ablösen der Kammern konnten die adhärenen Zellen auf diesem Objektträger immunzytochemisch markiert werden. Um eine für die mikroskopische Auswertung optimale Zelldichte zu erhalten, musste die Zellzahl pro Kammer zeitweise zwischen 18.000 und 25.000 variiert werden.

Die Ansätze wurden über Nacht in oben beschriebenen Inkubator belassen. Diese Zeit in serumhaltigem Medium war nötig, um auf den Objektträgern adhärente Zellen zu erhalten. Am nächsten Tag wurde das serumhaltige Medium erstmals gegen serumfreies DMEM substituiert (wiederum 0,5ml pro Kammer) und bis zur Färbung des Objektträgers alle 2 bis 4 Tage gewechselt.

Bei Aufsicht auf einen kammertragenden Objektträger ergab sich folgendes Schema:

Beschriftungsfeld des Objektträgers	Kammer 1	Kammer 2	Kammer 3	Kammer 4
	Kammer 5	Kammer 6	Kammer 7	Kammer 8

Es wurde immer wie folgt serumfreies Medium zugegeben:

- Kammer 1 – 4: serumfreies Medium ohne NGF
- Kammer 5 – 8: serumfreies Medium mit NGF (Sigma, Saint Louis, USA)

Bei einem Versuchsansatz wurden gleichzeitig mindestens 5 Objektträger mit zellhaltigem Medium versehen. Zur Färbung wurde an verschiedenen Zeitpunkten jeweils ein Objektträger des Versuches aus dem Inkubator entnommen und fixiert: Der erste wurde nach der oben erwähnten ersten Nacht in serumhaltigem Medium entnommen. Dies entspricht formell Tag 0 in serumfreiem Medium. Die übrigen Objektträger wurden nach obigem Schema mit serumfreiem Medium versehen. Am Tag 2, 6, 9 und 13 während der Serumdeprivation ist je ein Objektträger entnommen und gefärbt worden. Ohne offensichtlichen Einfluss auf die Ergebnisse musste aus praktischen Gründen der Entnahmezeitraum für einzelne Objektträger um einen Tag nach vorn oder hinten verlegt werden.

Um eine statistische Auswertung der Versuchsdaten zu ermöglichen, wurden für jede immunzytologische Markierung drei voneinander getrennt angesetzte, aber in allen zu beeinflussenden Parametern (Durchführung des Versuchsansatzes, Medium, Inkubationsbedingungen im Brutschrank, etc.) gleich behandelte Versuche durchgeführt. So standen für jede Markierung drei Versuche mit je fünf Objektträgern (fixiert jeweils am Tag 0, 2, 6, 9 bzw. 13) zur Verfügung. Aus den acht vorhandenen Kammern auf jedem Objektträger wurden immer nur zwei gefärbt, eine mit NGF-freiem und eine mit NGF-haltigem Medium. Es wurden hierfür die Kammern ausgewählt, welche eine für die mikroskopische Auswertung günstige Anordnung der Zellen aufwiesen. Das waren

diejenigen mit einer möglichst großen Anzahl an gleichmäßig verteilten Einzelzellen und nur wenig Zellhaufen. Auf den Objektträgern der Tage 2-13 wurden demzufolge je zwei Kammern, eine für serumfreies Medium ohne und eine für serumfreies Medium mit NGF ausgewertet. Am Tag 0 waren die Zellen nur eine Nacht in serumhaltigem Medium angewachsen, so dass hier noch keine Unterscheidung zwischen Zellen in serumfreiem Medium ohne oder mit NGF existierte. Es wurde demzufolge am Tag 0 auch nur eine Kammer ausgewertet.

Medien

DMEM serumfrei:

= Dulbecco's modified eagl's medium (Sigma, Saint Louis, USA, Cat No: D5671)

4500 mg/l Glucose

Pyridoxin

NaHCO₃

HCL

Antibiotika: Gentamicin ratiopharm® 50 µg/ml oder Penicillin 200 IE/ml mit Streptomycin 200 µg/ml (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)

DMEM komplett:

DMEM serumfrei mit:

10% fötalem Kälberserum (FBS, Seromed, Berlin)

Serumfreies Medium mit Nerve Growth Factor:

DMEM serumfrei mit

100 ng/ml NGF (NGF-7S von der Maus, Sigma, Saint Louis, USA)

3.2 Immunzytochemische Markierungen

Um Informationen über die Proliferation, die Neurotrophinrezeptor- und Kaliumkanalexpression zu gewinnen, wurden immunzytochemische Methoden angewandt. Dabei wird mit einem Primärantikörper das entsprechende Antigen vormarkiert. Im nächsten Schritt binden an diese Primärantikörper fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper. So werden diejenigen Zellen mit dem untersuchten Antigen im

Fluoreszenzmikroskop bei entsprechender Filterauswahl sichtbar.

Alle immunzytochemischen Markierungen einschließlich der TUNEL-Reaktion wurden an frisch fixiertem Zellmaterial durchgeführt.

3.2.1 Nachweis des Ki67 Antigens

Zuerst musste vorsichtig das Medium abgesaugt werden. Anschließend wurden die Zellen mit Zambonilösung 10min bei Raumtemperatur fixiert und drei mal 5min mit PBS gespült. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde eine Lösung aus PBS, Triton X-100 (0,2%, Sigma, Saint Louis, USA) und Rinderalbumin (3%, Sigma, Saint Louis, USA) für 10min in die Kammern gegeben. Um unspezifische Antikörperablagerungen möglichst gering zu halten, musste mit 10%igem Ziegenserum (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Californien, USA) in PBS für 15min geblockt werden. Ohne zwischenzeitiges Spülen wurde der Primärantikörper (Ki67 Antigen mouse monoclonal antibody, Novocastra Laboratories, Newcastle, England, in PBS mit 1% Ziegenserum) in einer Verdünnung von 1:100 aufgebracht und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Negativkontrollen wurden mit der gleichen Lösung ohne Primärantikörper versehen. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurde am nächsten Tag der Cy2-fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (CyTM-2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L), Dianova, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:100 in PBS mit 1% Ziegenserum) für 1,5h aufgetragen. Es folgte wiederum dreifaches Spülen mit PBS. Jetzt konnten die Kammern und die sie auf dem Objektträger fixierende Kittsubstanz entfernt werden. Abschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger mit PBS-gepufferten Glycerin (im Verhältnis 9:1) eingedeckt.

Lösungen für den Ki67-Nachweis

PBS (Phosphate Buffered Saline):

auf 1000 ml Aqua destilata:

NaCl 8g

KCl 0,2g

KH₂PO₄ 0,2g

NaHPO₄ · 2 H₂O 1,15g

pH 7,2 – 7,4

Zambonilösung:

150ml wässrige, heiße, gesättigte Pikrinsäure (filtriert) mit 20g Paraformaldehyd mischen, auf 60°C erhitzen, danach Zugabe von 2n NaOH bis Lösung klar ist.

Nach dem Abkühlen, mit PBS auf 1000ml fertige Zamboni-Lösung auffüllen.

pH 7,2 – 7,6

3.2.2 Nachweis der NGF-Rezeptoren trkA und p75

Zur Untersuchung der Zellen auf die Neurotrophinrezeptoren trkA und p75 wurde ähnlich wie bei dem Nachweis des Ki67-Antigens vorgegangen.

Nach der Entfernung des Kulturmediums aus den Kammern wurde mit 4%igem Paraformaldehyd in PBS für 10min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreifachem Spülen für je 5min wurde 8%iges Rinderserumalbumin (BSA, Sigma, Saint Louis, USA) in PBS zum blocken für 1h angewendet. Ohne Spülen wurde der Antikörper gegen den p75-Neurotrophinrezeptor (Monoclonal Mouse Anti-Human Nerve Growth Factor Receptor (NGFR), p75^{NGFR}, Dako, Carpinteria, USA, Verdünnung 1:50 in PBS mit 1% Rinderserumalbumin) bzw. trkA-Rezeptor (Trk A (763), rabbit, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien, USA Verdünnung 1:10 in PBS mit 1% BSA) aufgetragen. Für die Kopplung der Primärantikörper an das entsprechende Antigen reichten 1,5h bei Raumtemperatur. Nach dreifachem Spülen mit Spülpuffer wurde mit Cy2-fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (CyTM-2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L), Dianova, Hamburg, Deutschland) für den p75-Neurotrophinrezeptor und Cy3-fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (CyTM-3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L), Dianova, Hamburg, Deutschland) für trkA in einer Verdünnung von 1:100 in PBS mit 1% BSA für 1,5h inkubiert. Nach erneutem gründlichen Spülen konnten die Kammern von dem Objektträger entfernt und mit PBS-gepufferten Glycerin (9:1) und Deckgläsern eingedeckt werden.

Lösungen**PBS:**

Siehe oben

Spülpuffer:

PBS mit

MgCl₂ 1mM

CaCl₂ 1mM

3.2.3 Nachweis der Kaliumkanäle Kv1.3 und TASK

Das Vorgehen zum Nachweis der Kaliumkanalantigene entsprach dem des Ki67 Antigennachweises. Es wurden lediglich andere Antikörper verwendet.

Primärantikörper gegen die Kaliumkanäle:

- für den Kv1.3 Nachweis: Rabbit anti-Kv1.3, Purified Polyclonal Antibody, Chemicon, Temecula, Californien, USA, Verdünnung 1:100
- für den TASK Nachweis: Anti-TASK-1, rabbit polyclonal, Alomone labs, Jerusalem, Israel, Verdünnung 1:50

Als fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper wurde ein Cy3-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper (CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L), Dianova, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:100) verwendet.

Es wurden auch Doppelmarkierungen, z.B. für Kv1.3 und Ki67 durchgeführt. Dabei wurden gleichzeitig mit den verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Die weitere Behandlung entsprach derjenigen der Ki67-Markierung.

3.3 Cerebelläre Körnerzellkulturen

In einem Bericht von Millar et al. (2000) wird die Expression von TASK mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden in cerebellären Körnerzellkulturen beschrieben. Durch den Vergleich zwischen dem in dieser Untersuchung erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Bild nach Markierung mit Anti-TASK-Antikörpern mit dem unserigen sollte die Validität der von uns verwendeten Antikörper bestätigt werden.

Zum Anlegen von Körnerzellkulturen wurden embryonale Cerebellumanlagen der Wanderratte (*Rattus norvegicus*, Rattenembryonen E14, Stamm: Wistar, Herkunft: Tierhaus Beuthenberg, Jena, Muttertieralter ca. 3 Monate) verwendet und wie folgt vorgegangen:

Zu Beginn der **Präparation** wurde eine peritoneale Injektion von 7%igem Chloralhydrat (Sigma, Saint Louis, USA) vorgenommen. Nach ca. 5min trat der Exitus ein. Dann konnte die Bauchhöhle mit einer Schere eröffnet und die Embryonenkette mit einer anatomischen Pinzette entnommen werden. Die Embryohülle wurde mit zwei Kornzangen aufgerissen und die Embryonen zur weiteren Präparation unter ein binokulares Auflichtmikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena, Deutschland) gebracht.

Dort wurde nach Dekapitation der Kopf in Lösung 1 bis zur Freilegung des Gehirnes weiter präpariert, die Hirnhäute abgezogen und so gelegt, dass die beiden Hemisphären von dorsal zu sehen waren. Caudal der Hemisphären waren die Anlagen des Cerebellums zu erkennen. Nachdem die Hemisphären und die Medulla oblongata mit dem Skalpell abgetrennt waren, wurde das Cerebellum in kleine Quader geschnitten und in ca. 10ml Lösung 2 in ein Falcon-Tube gelegt.

Zur **Dissoziation** wurden 5ml von Lösung 2 entnommen und 500µl Trypsinlösung (0,25% in PBS, Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, Californien, USA) zugegeben. Nach 30min Inkubation bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln konnte der Überstand abgenommen und mittels 2ml MEM die Trypsinreaktion gestoppt werden. Es folgte Homogenisierung mittels Pasteurpipette (20 mal auf und abgezogen), Suspension durch ein steriles Gitternetz (Elimination der Hirnhautreste) zu je 1ml in 2 Eppendorf-Tubes und Zentrifugation bei 1000U/min für 5min. Nach Entnahme des Überstandes wurde die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt und auf ca. 2×10^6 Zellen/ml verdünnt. Dieses zellhaltige Kulturmedium wurde zu je 1ml auf beschichtete (Poly-L-Lysin und Laminin) Deckgläschen in 24 well plates ausgesät und die Ansätze im Steri-Cult 200 (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO₂ gehalten. Alle 2-3 Tage musste das Kulturmedium gewechselt werden.

Ca. 1 Stunde vor der Präparation wurde mit der **Beschichtung der Deckgläschen** begonnen. In PBS gelöstes Laminin (50µg/ml, Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Californien, USA) und Poly-L-Lysin (100µg/ml, Sigma, Saint Louis, USA) wurde zu 100µl auf ein Deckgläschen pipettiert und darauf ein zweites Deckgläschen gelegt (Sandwich-Beschichtung). Nach 1-2 Stunden im Brutschrank konnten die Deckgläschen voneinander abgehoben, mit PBS gespült und bis zum Aussäen an der Luft getrocknet werden.

Medien und Lösungen

Lösung 1:

GBSS (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Californien, USA) mit 65%iger Glucoselösung (zuvor mit destilliertem Wasser angesetzt):

50ml GBSS

500 µl Glucose (65%)

Lösung 2:

HBSS (ohne Ca und Mg, Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Californien, USA) mit 65%iger Glucoselösung:

10 ml HBSS

100 µl Glucose (65%)

Medium:

Dulbecco's modified eagl's medium (Sigma, Saint Louis, USA, Cat No: D5671)

4500 mg/l Glucose

Pyridoxin

NaHCO₃

HCL

10% fötales Kälberserum (FBS, Seromed, Berlin)

Antibiotika: Gentamicin ratiopharm® 50 µg/ml oder Penicillin 200 IE/ml mit Streptomycin 200 µg/ml (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)

3.4 TUNEL-Reaktion

Da auch der eventuelle Einfluss von Serumdeprivation und NGF auf die apoptotische Aktivität der 1321N1 Zelllinie untersucht werden sollte, wurde die TUNEL-Reaktion zur Markierung apoptotischer Zellen verwendet. Während des Apoptoseprozesses kann die genomische DNA sowohl in niedermolekulare DNS-Doppelstrangfragmente (Mono-/Oligonukleosomen) als auch in Einzelstränge ("nicks") höheren Molekulargewichts zerbrechen. Solche DNA-Strangbrüche können in einer enzymatischen Reaktion durch die Markierung freier 3'-OH-Enden mittels modifizierter Nukleotide identifiziert werden. Bei dem verwendeten Kit ("in situ cell death detection kit", Cat No 1684809, Boehringer

Mannheim, Deutschland) wird das Enzym Terminale-Desoxinukleotidyl-Transferase (TdT) genutzt, welches die Polymerisation von Nukleotiden (in diesem Fall Fluorescein-konjugierte-Digoxigenin-UTP) an freien 3'-OH-DNA-Enden katalysiert, um DNA-Strangbrüche nachzuweisen (TUNEL = TdT-mediated dUTP nick end labeling). Während der TUNEL-Reaktion werden mit Hilfe der Terminalen Desoxinukleotidyl-Transferase Fluorescein-konjugierte dUTP-Nukleotide als Antigen an die fragmentierte DNA angelagert. Diese können anschließend direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Günstiger erwies sich allerdings für uns die Umwandlung in eine lichtmikroskopisch auswertbare Markierung.

Begonnen wurde mit der Entfernung des Kulturmediums und Fixierung der Zellen in 4%igem Formalin (in PBS) für 45min. Anschließend wurde drei mal 5min mit PBS gespült. Zur Permeabilisation wurde PBS mit 0,1% Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, USA) und 0,1% Natriumcitrat für 2min verwendet. Zur schonenden Permeabilisierung wurde der Objektträger während dieser Zeit auf einen Eisbeutel gestellt. Nach dreimaligem Spülen konnten die Kammern von den Objektträgern vorsichtig entfernt werden. Für die TUNEL-Reaktion wurde auf zwei Kammergrundflächen des Objektträgers 50ml Fluorescein-konjugierte-d-UTP und die Terminale-Desoxinukleotidyl-Transferase in der vom Hersteller vorgegebenen Verdünnungslösung 9:1 aufgetragen und für 1h bei 37°C inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde nur die reine Verdünnungslösung (Fluorescein-konjugierte-d-UTP ohne Enzym) aufgetragen. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung dieser Substanz auf der zellentragenden Objektträgerfläche zu erhalten, wurde diese mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dieses verhinderte auch das Austrocknen der Reaktionsfläche. Die TUNEL-Reaktion wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS beendet.

Um diese Markierung lichtmikroskopisch auswerten zu können, wurde mit einem Anti-Fluorescein-Antikörper weitergearbeitet. Dieser war mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Da es sich bei der alkalischen Phosphatase um ein ubiquitär vorkommendes Enzym handelt, muss die endogene AP vorher inhibiert werden. Aus diesem Grund wurde für 60min bei Raumtemperatur mit der Blockerlösung inkubiert (Blockerpuffer mit 1% Kaninchenserum (Dako, Glostrup, Dänemark) und 1% Blockerreagenz (Roche, Mannheim, Deutschland)). Hiernach folgte die Kopplung mit der Konverter AP (30min bei 37°C). Dabei wurde auch mit einem Deckglas abgedeckt. Es folgte dreimaliges Spülen in PBS. Anschließend wurde die Entwicklerlösung (NBT/BCIP Stock Solution, Roche, Mannheim, Deutschland, 1:50 in Entwicklungspuffer) aufgetragen.

Auf einem Schüttler in Dunkelheit wurde 10 bis 20min unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle der Visualisierungsprozess verfolgt und bei ausreichend intensiver Markierung durch Spülen unter fließend Wasser beendet. Für eine bessere lichtmikroskopische Auswertbarkeit wurde für 2min mit Lichtgrün gegengefärbt. Abschließend wurden die Zellen gespült und mit Glyceringelantine (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

Lösungen

Blockerpuffer:

PH 7,7

Tris Base 100mM

NaCl 150mM

Entwicklungspuffer:

NaCl 100mM

Tris Base 100mM

MgCl₂ 50 mM

Mit konzentrierter KCl (ca. 0,5ml) auf ph 9,5 eingestellt

Lichtgrün:

0,1 – 0,2g Lichtgrün (Sigma, Saint Louis, USA) auf 100ml 0,2%ige Essigsäure

3.5 Bewertung

Die **mikroskopische Auswertung** wurde für jede ausgewählte und immunzytologisch markierte Kammer einzeln vorgenommen. In der jeweiligen Kammer wurden fünf verschiedene, für den jeweiligen Tag in serumfreiem Medium repräsentative Blickfelder (400fache Vergrößerung) ausgewählt. Danach wurden die Zellen im Phasenkontrast drei Morphologiegruppen zugeteilt:

- runde Zellen (ohne und mit Fortsätze)
- fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze
- fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen (Eine fibroblastenähnliche Zelle mit einem zytoplasmatischen Fortsatz, der länger als der Zellkörperdurchmesser war, wurde der Gruppe mit Fortsätzen zugerechnet.)

Die immunzytologischen und TUNEL-Markierungen wurden jeweils nach Morphologiegruppen ausgewertet. Es wurde der Anteil der positiv markierten Zellen einer Morphologiegruppe und deren Gesamtzahl erfasst. Günstig erwies sich hierbei die Möglichkeit der Umschaltung zwischen Fluoreszenz- (Immunzytologische Bewertung) und Phasenkontrastmodus (Morphologie), ohne das Blickfeld zu verschieben. Bei der Auswertung der durch die TUNEL-Reaktion markierten Zellen erübrigte sich das. Hier konnten in einem Schritt die Zellkonturen und die TUNEL-Reaktion phasenkontrastmikroskopisch korreliert werden.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die Zahlen aller Zellen einer Form aus den fünf Blickfeldern einer Kammer addiert. Ebenso wurde die Summe der positiv markierten Zellen errechnet. Schließlich konnte der prozentuale Anteil der positiven Zellen einer Morphologiegruppe an einem bestimmten Tag in serumfreien Medium errechnet werden (siehe Abb. 1). Es wurde auf eine Dezimalstelle gerundet.

	Blickfeld 1	Blickfeld 2	Blickfeld 3	Blickfeld 4	Blickfeld 5		Summe aller fünf Blickfelder		Anteil der pos. Zellen
runde Zellen	ges.: 1 pos.: 1	ges.: 0 pos.: 0	ges.: 1 pos.: 1	ges.: 0 pos.: 0	ges.: 0 pos.: 0	→	ges.: 2 pos.: 2	→	100 %
fibroblastenähnll. Zellen ohne Fortsätze	ges.: 8 pos.: 0	ges.: 10 pos.: 2	ges.: 10 pos.: 4	ges.: 21 pos.: 3	ges.: 16 pos.: 7	→	ges.: 65 pos.: 16	→	24,6 %
fibroblastenähnll. Zellen mit Fortsätzen	ges.: 18 pos.: 3	ges.: 12 pos.: 3	ges.: 3 pos.: 0	ges.: 5 pos.: 2	ges.: 4 pos.: 1	→	ges.: 42 pos.: 9	→	21,4 %

Abb. 1: Beispiel zum Auswertungsschema

Ausgezählt wurde eine Kammer im ersten p75 markierten Versuch am Tag 2 mit serumfreiem Medium ohne NGF. In dieser Kammer wurden fünf verschiedene Blickfelder ausgewählt und die Gesamtzahlen der Zellen einer Morphologiegruppe (ges.:), sowie der Anteil der positiv markierten Zellen erfasst (pos.:). Daraus wurde der Prozentuale Anteil der p75-positiven Zellen für jede Zellform errechnet (rechte Spalte).

Die **statistische Auswertung** der Daten wurde mit dem Programm SPSS durchgeführt. Als Beobachtungseinheit im Sinne eines Ereignisses wurde hierbei eine Zellform in einer ausgewerteten Kammer bestimmt. Als Variablen ergaben sich: Versuchsnummer, Markierung, Zeit in serumfreiem Medium, Art des serumfreien Mediums, Zellform, absolute Anzahl der Zellen einer Zellform in den fünf ausgezählten Blickfeldern, absolute Anzahl der positiv markierten Zellen einer Zellform, relativer Anteil der positiv markierten

Zellen einer Zellform in Prozent, Gesamtanzahl der Zellen aus allen fünf ausgewerteten Blickfeldern und relativer Anteil der Zellform in den ausgewerteten Blickfeldern.

Aus dieser Datenmenge konnten nun verschiedene Stichproben definiert und auf statistisch signifikante Unterschiede getestet werden. Da bei diesem Datenmaterial nicht von Verträglichkeit mit einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Ab einem zweiseitigen p-Wert von unter 0,05 wurde der Unterschied als statistisch signifikant gewertet.

Für die Untersuchungen kam das Axiophot-2 **Mikroskop** (Zeiss, Jena, Deutschland) zum Einsatz. Neben der Ausrüstung für Epifluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie wurde mit einer 3-Chip-CCS-Kamera vom Typ Sony DXC-930P (Sony, Tokyo, Japan) gearbeitet.

An Objektiven standen Plan-Neofluar für die Phasenkontrast- und Plan-Apochromat für die Fluoreszenzmikroskopie mit den Vergrößerungen 20x und 40x zur Verfügung. Als Lichtquelle für die Epifluoreszenzmikroskopie wurde eine 100W Quecksilberdampflampe (HBO 100) verwendet. Die Cy2-Signale (grün) wurden mittels Filterset FS09, die Cy3-Signale (rot) mittels Filterset FS15 (Zeiss, Jena, Deutschland) dargestellt. Aufnahmen erfolgten über die am TV-Port angeschlossene CCD-Kamera.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Zellmorphologie

Im Folgenden wird die relative Häufigkeit der einzelnen Morphologiegruppen während der Versuchszeit anhand der Mittelwerte aus allen 10 ausgezählten Versuchen dargestellt. Hierbei sollten die von Kraft et al. (2001) beschriebenen, auf eine neuronenhähnliche Differenzierung hindeutenden morphologischen Veränderungen besonders beachtet werden, wobei das Auftreten von fortsatztragenden runden Zellen den morphologischen Kriterien einer solchen Differenzierungsrichtung entspricht.

Abbildung 2 zeigt ein Phasenkontrastbild, auf dem Zellen aller drei Morphologiegruppen zu erkennen sind. Abbildung 3 gibt die prozentualen Anteile der einzelnen Morphologiegruppen an den untersuchten Tagen in serumfreiem Medium wieder.

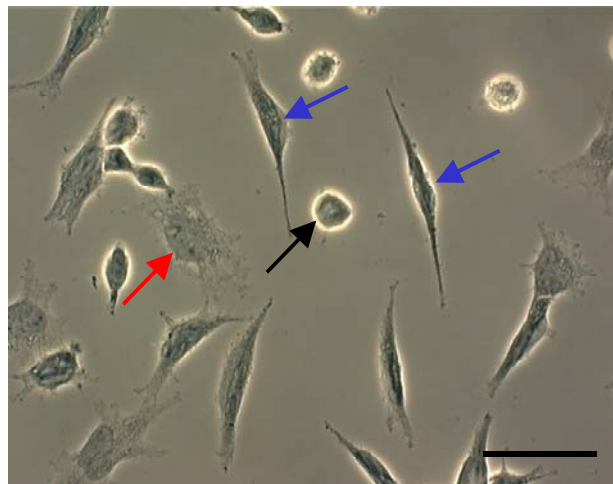


Abb. 2: Beispiele für die Morphologiegruppen

1321N1-Zellen nach 6 Tagen unter Serumdeprivation ohne NGF, Phasenkontrast, Bar = 50µm; es sind Zellen aller drei Morphologiegruppen zu erkennen: runde Zellen (schwarzer Pfeil), fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze (roter Pfeil) und fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen (blaue Pfeile). Fibroblastenähnliche Zellen mit einer Fortsatzlänge von mindestens einem Zellkörperdurchmesser wurden der Gruppe mit Fortsätzen zugerechnet.

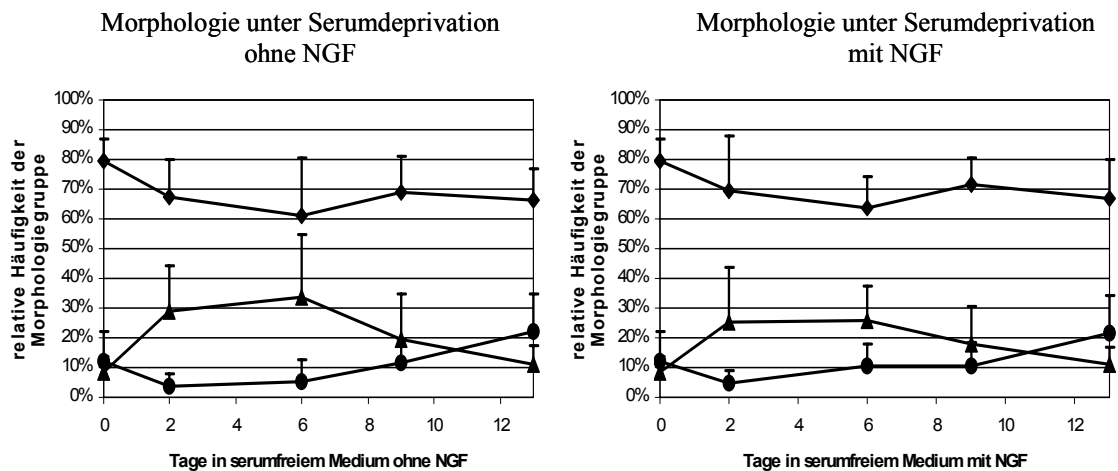


Abb. 3: Zellmorphologie während der Serumdeprivation

Es sind die Mittelwerte der relativen Häufigkeiten von Zellen der einzelnen Morphologiegruppen aus 10 Versuchen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Intervalle von den Einzelwerten nach oben abgetragen. Links: Kurven für serumfreies Medium ohne NGF; rechts: Kurven für serumfreies Medium mit NGF (100ng/ml). Tag 0 ist in beiden Diagrammen aufgrund der Versuchsanordnung gleich.

●-runde Zellen, ◆-fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze, ▲-fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen

Es wurde zwischen folgenden **Zellformen** unterschieden:

- runde Zellen
- fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze
- fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen

Der Anteil runder Zellen mit Fortsätzen war zu jedem Zeitpunkt der Versuche minimal vorhanden (maximal 2%) und konnte deshalb nicht als eine eigene Morphologiegruppe ausgewertet werden.

Für die einzelnen Häufigkeiten der Morphologieklassen stehen alle 10 ausgewerteten Versuche zur Verfügung. Folgendes lässt sich ablesen:

Beim optischen und teststatistischen Vergleich der Diagramme ist kein deutlicher Unterschied in den Häufigkeiten der einzelnen Zellformen zwischen serumfreiem Medium ohne und mit NGF zu erkennen ($p > 0,05$).

Die zu jedem Zeitpunkt häufigste Morphologiegruppe sind fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze ($p < 0,05$), sowohl unter Serumentzug ohne als auch mit NGF. Im Mittel ergibt sich für alle ausgezählten Kammern (alle Tage und Medien) eine relative Häufigkeit dieser Zellform von 68,3 %.

Vergleicht man die Häufigkeiten der runden Zellen gegen die der fibroblastenähnlichen mit Fortsätzen, stellt man folgendes fest: Am Tag 2 und 6 in

serumfreiem Medium sind die fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen signifikant häufiger als die runden Zellen. Das wendet sich jedoch bis zum Tag 13. Hier dominieren die runden Zellen über die fibroblastenähnlichen mit Fortsätzen. Am Tag 0 und 9 ergeben sich teststatistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Morphologiegruppen ($p > 0,05$).

Unabhängig von Medium und Zeit sind die runden Zellen die insgesamt seltenste Zellform ($p < 0,05$). Für diesen Test sind die einzelnen Ergebnisse aus allen Kammern unabhängig von Versuchstag oder Medium gleichberechtigt zusammengelegt worden.

Wie aus den Diagrammen ersichtlich, ist die Häufigkeit der einzelnen Morphologiegruppen während der Zeit des Serumentzuges Schwankungen unterworfen. Diese sollen im folgenden näher beschrieben werden:

Den höchsten Wert erreichen die **fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze** am Tag 0 mit 79,5%. Bis Tag 6 fällt ihre Häufigkeit unter Serumdeprivation ohne NGF auf 60,9% und mit NGF auf 63,6% ab. Danach steigt die Kurve nur wenig an (Tag 9 ohne NGF 98,9%, mit NGF 71,6%) und fällt bis zu Tag 13 wieder auf 66,4% ohne bzw. 67,1% mit NGF ab.

Bei der Auswertung mit statistischen Tests kann man auch die Häufigkeit einer Zellform zwischen zwei verschiedenen Versuchstagen gegeneinander testen. So lässt sich entscheiden, ob der Anstieg oder Abfall einer Kurve in Abbildung 3 signifikant oder wahrscheinlich nur zufällig bedingt ist. In Bezug auf die fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze ist nur der Rückgang der Werte zwischen Tag 0 und 6 in Medium ohne und mit NGF teststatistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Schwankungen zwischen Tag 6 und 13 können zufallsbedingt sein ($p > 0,05$).

Die Häufigkeit der **runden Zellen** fällt zunächst zwischen Tag 0 und 2 von 12% auf unter 5% ab. Danach ist ein langsamer Anstieg auf 22,2% in serumfreiem Medium ohne NGF und 21,7% in serumfreiem Medium mit NGF am Tag 13 zu erkennen. Sowohl der initiale Rückgang, als auch der danach folgende Anstieg der runden Zellen ist signifikant.

Umgekehrt erscheint der Kurvenverlauf bei den **fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen**. Deren Häufigkeit am Tag 0 ist nahe derjenigen der runden Zellen ungefähr 8,5%. Bis zu Tag 6 in serumfreien Medium steigt sie jedoch auf 33,7% in serumfreiem

Medium ohne NGF und 25,7% in serumfreiem Medium mit NGF. Danach fällt die Kurve wieder, und am Tag 13 sind Werte nahe denen am Tag 0 erreicht. Der Anstieg der Werte von Versuchsbeginn bis Tag 6, sowie der danach folgende Rückgang der Häufigkeit bis Tag 13 ist mit $p < 0,05$ deutlich.

4.2 Einfluss der Serumdeprivation auf die Neurotrophinrezeptoren trkA und p75

4.2.1 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die trkA-Expression

Ein für die Markierung der 1321N1-Zellen mit Anti-trkA-Antikörpern typisches Bild ist in Abbildung 4 dargestellt.

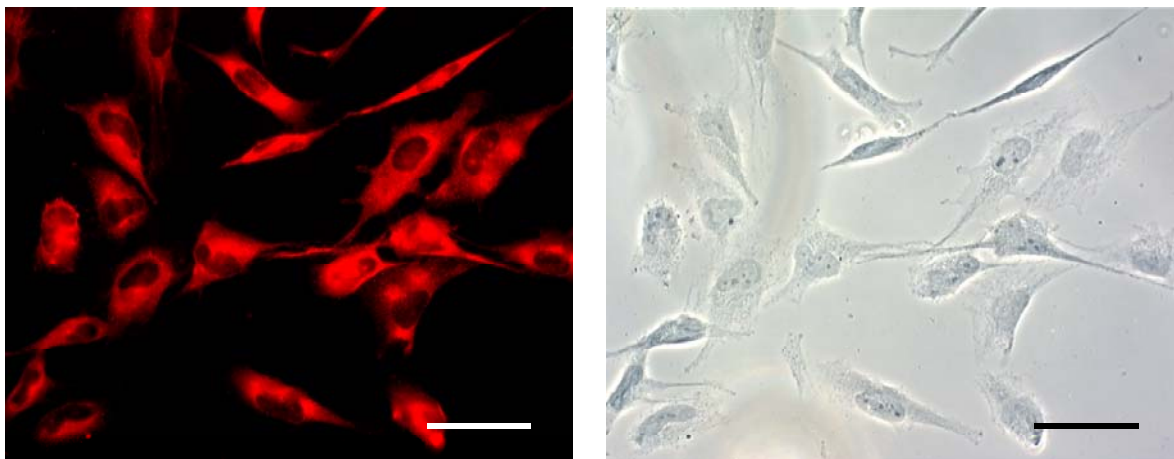


Abb. 4: Anti-trkA-markierte 1321N1-Zellen

1321N1-Zellen nach 2 Tagen unter Serumdeprivation ohne NGF, Anti-trkA-Markierung im Fluoreszenzmodus (links) und das gleiche Blickfeld im Phasenkontrast (rechts), Bar = 50µm; alle Zellen sind für Anti-trkA-Antikörper positiv und zeigen eine feingepunktete Markierung des Zytoplasmas.

Zu jedem Zeitpunkt der Serumdeprivation und am Tag 0 kann man für trkA das gleiche fluoreszenzmikroskopische Bild feststellen: Es zeigt sich eine feingepunktete, wahrscheinlich zytoplasmatisch lokalisierte Fluoreszenz, welche in jeder Zelle, gleich welcher Zellform, vorhanden ist. Der Zellkern ist deutlich ausgespart.

Runde Zellen scheinen nur wenig intensiver zu fluoreszieren. Dies könnte durch ihre zellformbedingte Konzentration des Zytoplasmas um den Kern verursacht werden.

4.2.2 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die p75-Expression

Bei der Markierung der Zellen mit anti-p75-Neurotrophinrezeptor-Antikörpern sind nicht alle Zellen gleichmäßig intensiv markiert. Es kann zwischen p75-positiven und -negativen Zellen unterschieden werden. P75-positive Zellen zeigen im Fluoreszenzmikroskop eine deutliche membranassoziierte Fluoreszenz, welche die Zellgrenzen nachzeichnet. Auch Zellfortsätze sind markiert (Abbildung 6).

Zuerst soll mit Hilfe des Säulendiagrammes in Abbildung 5 der mittlere Anteil p75-positiver Zellen in den Morphologiegruppen betrachtet werden. Hier wurden die Mittelwerte der untersuchten Tage (0, 2, 6, 9 und 13) getrennt für serumfreies Medium ohne und mit NGF aufgetragen.

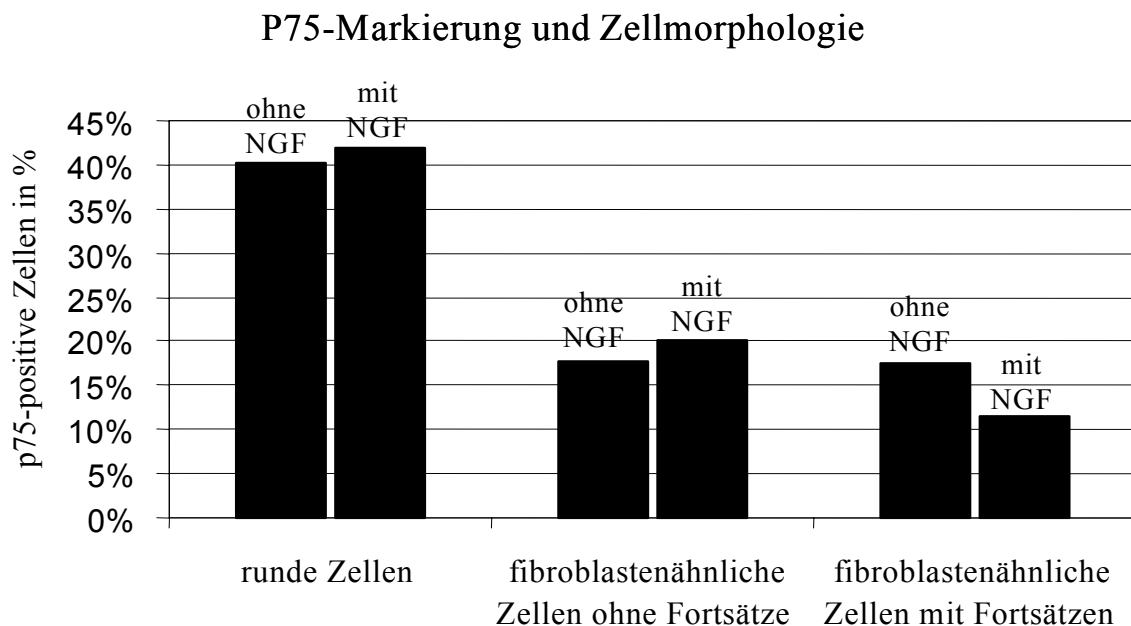


Abb. 5: Mittlerer Anteil p75-positiver Zellen in den Morphologiegruppen

Eine Säule stellt den prozentualen Anteil p75-positiver Zellen in einer Morphologiegruppe unabhängig von der Dauer des Serumentzuges dar. Es sind jeweils die Mittelwerte aus den Prozenten am Tag 0, 2, 6, 9 und 13 der Serumdeprivation ohne und mit NGF angegeben. Die Werte der runden Zellen sind signifikant höher als die der anderen Morphologiegruppen ($p < 0,05$). Eine weitere Rangfolge lässt sich statistisch nicht sichern. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen Serumdeprivation ohne und mit NGF.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die runden Zellen sowohl in serumfreiem Medium ohne als auch mit NGF den höchsten Anteil p75-positiver Zellen besitzen (40,3% ohne NGF, 41,9% mit NGF). Dies lässt sich mit $p < 0,05$ statistisch sichern. Da die Unterschiede

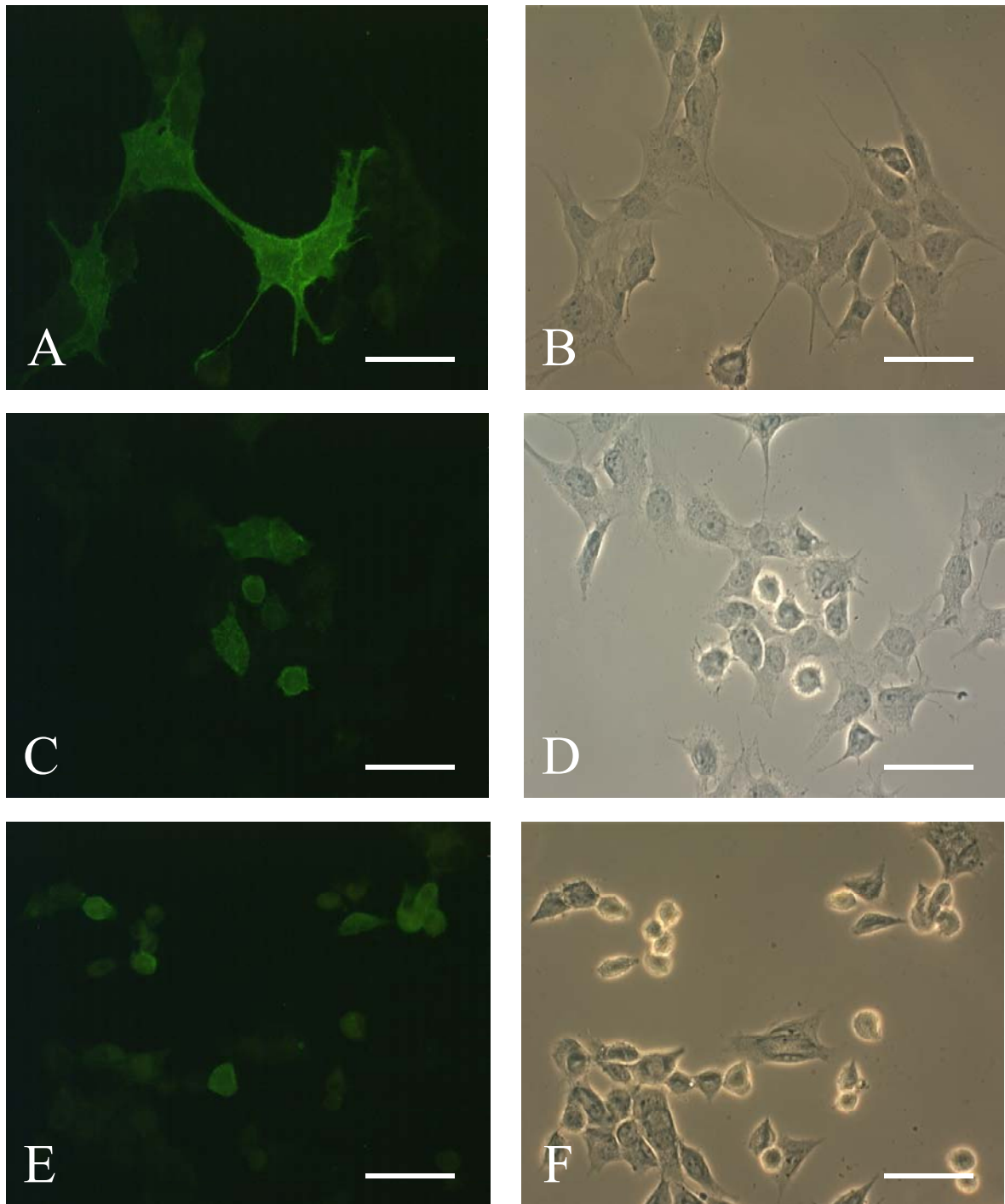


Abb. 6: 1321N1-Zellen nach Markierung mit Anti-p75-Antikörpern

A,B – 1321N1 nach 6 Tagen unter Serumdeprivation, p75-Markierung (**A**) und gleiches Blickfeld im Phasenkontrast (**B**), Bar = 50µm; es sind p75-positive fibroblastenähnliche Zellen zu erkennen. Sie zeigen ein deutlich membranassoziertes Fluoreszenzsignal des Zellkörpers und der Fortsätze (**A**). P75-negative Zellen sind nur im Phasenkontrastmodus zu erkennen.

C,D – 1321N1 nach 9 Tagen unter Serumdeprivation ohne NGF, p75-Markierung (**C**) und gleiches Blickfeld im Phasenkontrast (**D**), Bar = 50µm; es sind fibroblastenähnliche und runde p75-positive Zellen dargestellt. Unter den wenigen runden Zellen am Tag 9 sind häufig p75-positive Zellen zu finden.

E,F – 1321N1 nach 13 Tagen unter Serumdeprivation mit NGF, p75-Markierung (**E**) und gleiches Blickfeld im Phasenkontrast (**F**), Bar = 50µm; die Häufigkeit p75-positiver Zellen ist unter den runden Zellen deutlich höher als unter den fibroblastenähnlichen Zellen.

zwischen den fibroblastenähnlichen Zellen ohne und mit Fortsätzen nicht signifikant sind, kann man keine weitere Rangfolge aufstellen. Bei den fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze zeigen 17,8% (ohne NGF) bzw. 20,1% (mit NGF) der Zellen eine deutliche Markierung. Unter den fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen sind es unter Serumdeprivation ohne NGF 17,5%, unter Serumentzug mit NGF 11,6%.

Beim Vergleich der Werte zwischen Kultivierung in serumfreiem Medium ohne und mit NGF kann kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Da der Anteil p75-positiver Zellen während des Serumentzuges nicht konstant ist, lohnt es sich, ihn in Bezug auf die Zeit unter Serumentzug zu betrachten. Um diesen Sachverhalt zu quantifizieren, wurden drei Versuche mit anti-p75-Antikörpern markiert und die Mittelwerte der relativen Häufigkeit p75-positiver Zellen für die Morphologiegruppen an den Tagen 0, 2, 6, 9 und 13 unter Serumentzug ohne und mit NGF errechnet. Bei Darstellung dieser mittleren relativen Häufigkeiten p75-positiver Zellen ergibt sich, wie in Abbildung 7 gezeigt, für jede Morphologiegruppe eine Kurve für Serumdeprivation ohne und eine für Serumdeprivation mit NGF.

Es lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kurven ohne und mit NGF erkennen.

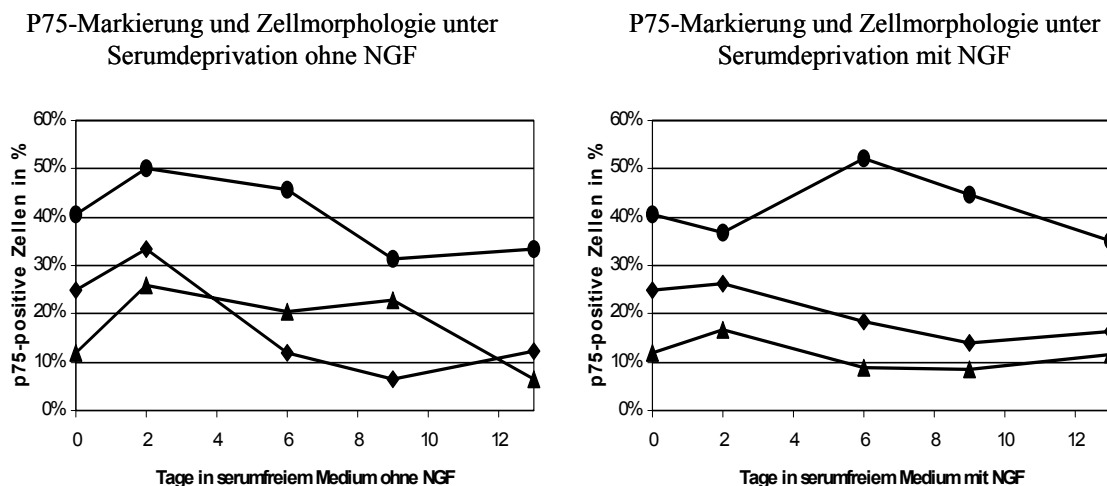


Abb. 7: Häufigkeit p75-positiver Zellen während der Serumdeprivation

Dargestellt ist die relative Häufigkeit p75-positiver Zellen in jeder einzelnen Morphologiegruppe während der Serumdeprivation ohne (links) und mit NGF (rechts). Es sind die Mittelwerte aus den drei p75-markierten Versuchen dargestellt. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven für Serumentzug ohne und mit NGF vorhanden. An jedem untersuchten Tag haben die runden Zellen den größten Anteil p75-positiver Zellen. Statistisch signifikant wird dieser Unterschied allerdings nur bei Betrachtung der Ergebnisse unabhängig von der Zeit, wie in Abbildung 5 dargestellt.

●-runde Zellen, ◆-fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze, ▲-fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen

Ebenso sind die im folgenden beschriebenen Ergebnisse lediglich Tendenzen. Statistisch signifikante Unterschiede ergeben sich bei ihnen nicht.

Am Tag 0 sind 25% der **fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze** p75-positiv. Dieser Anteil steigt bis Tag 2 auf 33,3% ohne und 26,3% mit NGF und fällt wiederum bis Tag 9 auf unter 10% ab. Bei Versuchsende liegen die Kurven bei 12,4% bzw. 16,4%.

Die **fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen** haben anfangs 12% p75-positive Zellen. Am Tag 2 sind 25,8% unter Serumdeprivation ohne NGF und 16,7% mit NGF positiv. In Medium ohne NGF verläuft die Kurve jetzt ohne größere Schwankungen, um zwischen Tag 9 und 13 auf 6,5% abzufallen. In serumfreiem Medium mit NGF fällt die Kurve sofort auf 9% am Tag 6 ab und steigt nur wenig bis 11,7% am Tag 13.

4.3 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Ki67-Markierung

Um die proliferative Aktivität der 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation zu untersuchen, wurde die Anti-Ki67-Markierung verwendet. Das Ki67-Protein kommt während der G₁-, S-, M- und G₂-Phase des Zellzyklus im Nukleus vor (Schlüter et al. 1993, Alkiza et al. 2000). Die in dieser Markierung positiven Zellen stellen somit die proliferativ aktive Fraktion der 1321N1-Zellen dar.

In Abbildung 9 sind für die jeweiligen Tage unter Serumdeprivation typische Bildbeispiele für die Anti-Ki67-Markierung zu erkennen. Ki67-positive Zellen sind durch eine im Fluoreszenzmikroskop deutliche Markierung des Zellkernes gekennzeichnet. Es zeigt sich dann eine punktförmige bis unregelmäßige schollige Fluoreszenz innerhalb des Nukleus. Das Zytoplasma ist stets negativ.

Der Anteil Ki67-positiver Zellen ist in den Morphologiegruppen unterschiedlich. An den untersuchten Tagen unter Serumdeprivation haben die fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen den durchschnittlich höchsten Anteil Ki67-positiver Zellen. Die Mittelwerte aus den Werten an den Tagen 0, 2, 6, 9 und 13 unter Serumdeprivation betragen 32,7% in Medium ohne und 36,2% in Medium mit NGF (Abbildung 8). Es folgen die

fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze (27,9% in Medium ohne NGF, 27,8% in Medium mit NGF). Die runden Zellen haben den geringsten Anteil mitotisch aktiver Zellen (18,6% in Medium ohne NGF, 18,9% in Medium mit NGF).

Teststatistisch ist nur die Differenz zwischen den runden und fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen für Serumentzug ohne und mit NGF mit $p < 0,05$ signifikant.

Betrachtet man die Prozentsätze Ki67-positiver Zellen aber nicht nur unabhängig von der Zeit unter Serumdeprivation, sondern auch unabhängig vom Medium (ohne oder mit NGF) und fasst die Stichproben für Medium ohne und mit NGF zusammen, erhält man folgende signifikante Rangfolge mit abfallenden Prozentsatz Ki67-positiver Zellen: fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätze - fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze - runde Zellen.

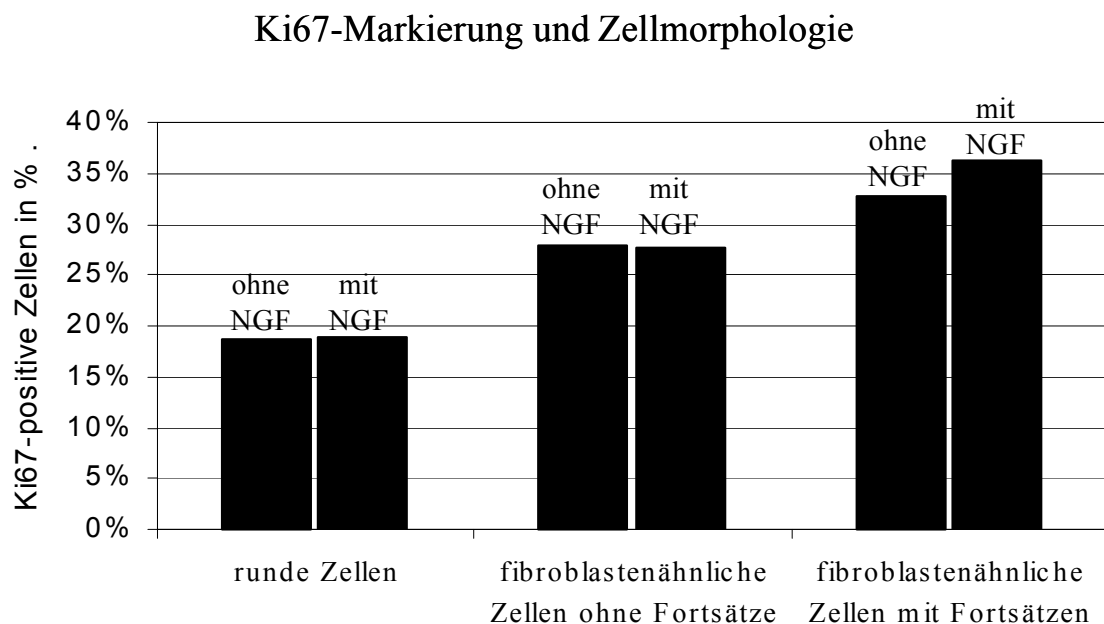


Abb. 8: Mittlerer Anteil Ki67-positiver Zellen in den Morphologiegruppen

Es ist der mittlere Anteil Ki67-positiver Zellen in den Morphologiegruppen während der Serumdeprivation dargestellt. Eine Säule ergibt sich als Mittelwert der Anteile positiver Zellen der Tage 0, 2, 6, 9 und 13 unter Serumdeprivation. Die linken Säulen geben die Werte unter Serumentzug ohne NGF, die rechten Säulen die Werte unter Serumentzug mit NGF wieder. Signifikante Differenzen bestehen nur zwischen den runden und den fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen in Medium ohne und mit NGF ($p < 0,05$). Die Werte für Serumentzug ohne und mit NGF gleichen sich weitgehend ($p > 0,05$).

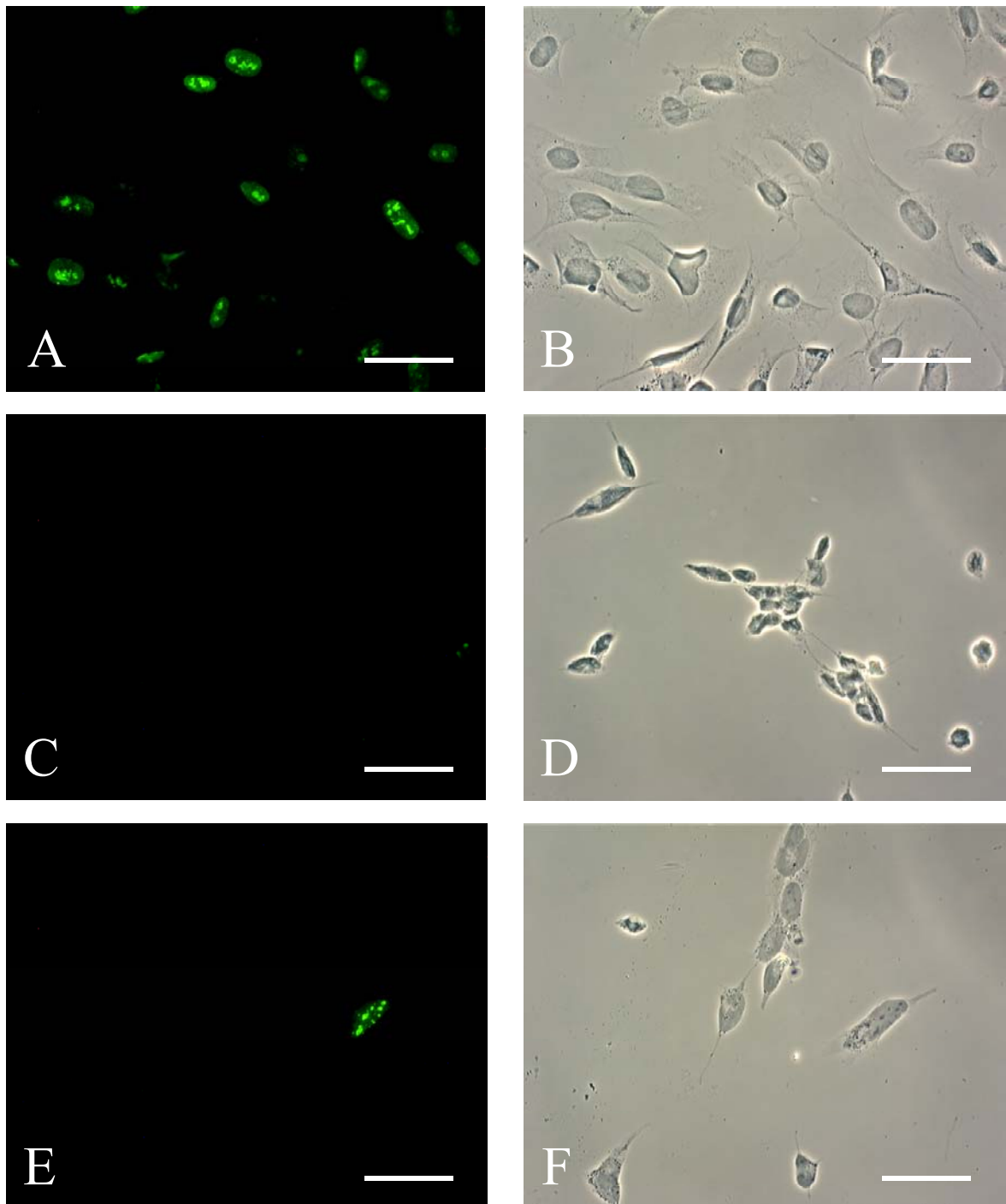


Abb. 9: Ki67-markierte 1321N1-Zellen unter Serumentzug

A,B – 1321N1-Zellen, 24h in serumhaltigem Medium (entspricht Versuchstag 0), Ki67-Markierung (**A**) und gleiches Blickfeld im Phasenkontrast (**B**), Bar = 50µm; ein großer Anteil der Ki67 Zellen ist nach einem Tag in serumhaltigem Medium (Tag 0) Ki67-positiv. Man erkennt sie an der deutlichen Fluoreszenzmarkierung in **A**, Ki67-negative Zellen sind nur im Phasenkontrast zu erkennen.

C-F – 1321N1-Zellen am Tag 13 unter Serumdeprivation ohne (**C,D**) und mit NGF (**E,F**), Ki67-Markierung (**C,E**) und gleiche Blickfelder im Phasenkontrast (**D,F**), Bar = 50µm; im Gegensatz zu Tag 0 (**A,B**) ist am Tag 13 nur ein sehr kleiner Anteil der Zellen Ki67-positiv.

Der Anteil Ki67-positiver Zellen sinkt deutlich während der Serumdeprivation (Abbildung 10). Die Verringerung dieses Prozentsatzes verläuft in den Morphologiegruppen sehr ähnlich, zwischen runden und fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen fast parallel. Auch hier lassen sich keine Differenzen zwischen der Serumdeprivation ohne und mit NGF erkennen ($p>0,05$).

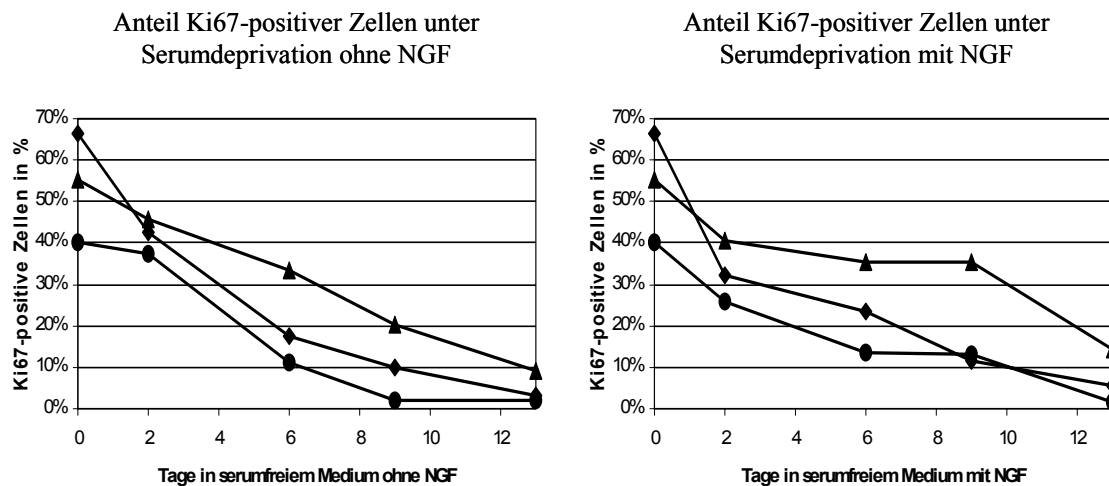


Abb. 10: Häufigkeit Ki67-positiver Zellen während der Serumdeprivation

Dargestellt ist der Prozentsatz Ki67-positiver Zellen in den Morphologiegruppen unter Serumdeprivation ohne (links) und mit NGF (rechts). Es sind die Mittelwerte aus drei Ki67-markierten und ausgezählten Versuchen dargestellt. Der Anteil Ki67-positiver Zellen in jeder Morphologiegruppe sinkt während der Serumdeprivation.

●-runde Zellen, ◆-fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze, ▲-fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen

Im folgenden sollen die Veränderungen des Anteils Ki67-positiver Zellen in den einzelnen Morphologiegruppen, wie in Abbildung 10 dargestellt, näher beschrieben werden. Aufgrund der geringen Versuchsanzahl lassen sich diese, im Diagramm relativ eindeutigen Tendenzen allerdings nicht statistisch belegen ($p>0,05$).

Die **fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen** sind am Tag 0 zu 55,3% positiv. Dieser Anteil verringert sich fast kontinuierlich bis Tag 13 auf 9,1% ohne bzw. 14,5% mit NGF.

Anfangs relativ stark, zwischen späteren Tagen der Serumdeprivation langsamer abfallend verläuft die Kurve der **fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze** in Abbildung 10. Am Tag 0 hat diese Zellform mit 66,4% die größte Fraktion Ki67-positiver Zellen. Nach schneller Reduktion auf 17,4% bis Tag 6 in serumfreiem Medium ohne NGF und 32,2% bis Tag 2 in serumfreiem Medium mit NGF, sinkt der Anteil Ki67-positiver Zellen ähnlich

schnell denen der anderen Zellformen. Am Tag 13 unter Serumentzug liegt er bei 3,3% in Medium ohne und 5,4% in Medium mit NGF.

Die **runden Zellen** verringern den Anteil Ki67-positiver Zellen von 40,2% am Tag 0 auf 2,1% (ohne NGF) bzw. 1,8% (mit NGF) am Tag 13.

4.4 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die TUNEL-Markierung

Zur Untersuchung der Apoptoserate von 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation wurde die TUNEL-Reaktion verwendet.

Im Phasenkontrastmodus erkennt man TUNEL-positive Zellen, wie in Abbildung 11 gezeigt, an einer braunen Färbung des Nukleus. In diesen repräsentativen Bildbeispielen ist aufgezeigt, wie sich der Anteil TUNEL-positiver Zellen zwischen den Morphologiegruppen unterscheidet und auch während der Zeit des Serumentzuges verändert.

Um die verschiedenen Häufigkeiten TUNEL-positiver Zellen in den Morphologiegruppen zu verdeutlichen, wurden die aus den Tagen 0, 2, 6, 9 und 13 gemittelten Werte für die einzelnen Zellformen jeweils in Medium ohne und mit NGF als Säulendiagramm in Abbildung 12 dargestellt.

Es zeigt sich bei dieser Betrachtungsweise, ohne die Zeit der Serumdeprivation zu beachten, dass die runden Zellen die durchschnittlich größte Fraktion TUNEL-positiver Zellen besitzen. Sie liegt bei 23,4% in serumfreiem Medium ohne und 36,3% in serumfreiem Medium mit NGF. Fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze haben mit 8,4% (ohne NGF) bzw. 8,5% (mit NGF) die niedrigste mittlere relative Häufigkeit TUNEL-positiver Zellen. Die der fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen liegt zwischen diesen beiden Morphologiegruppen. Mit 21,9% ist auch hier, wie bei den runden Zellen, der Anteil TUNEL-markierter Zellen in serumfreiem Medium mit NGF deutlich größer als mit 15,9% in serumfreiem Medium ohne NGF.

Von diesen Feststellungen lässt sich allerdings nur diejenige statistisch sichern ($p < 0,05$), dass unter Serumdeprivation mit NGF die runden Zellen den größten Anteil TUNEL-positiver Zellen besitzen.

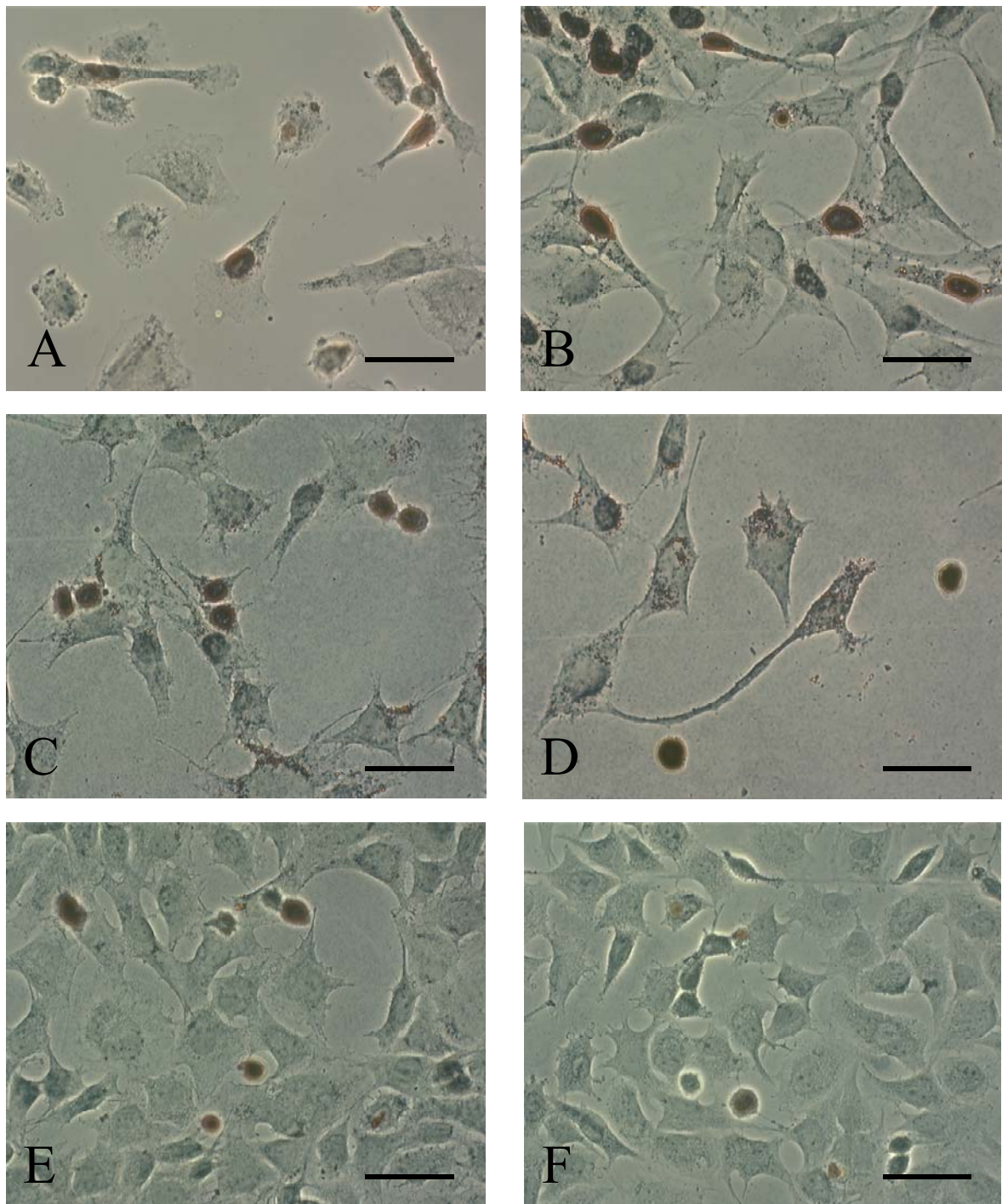


Abb. 11: TUNEL-markierte 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation

A-F – 1321N1 an den unten angegebenen Tagen unter Serumdeprivation, TUNEL-Markierung im Phasenkontrast, Bar = 50µm; TUNEL-positive Zellen sind an der braunen Markierung des Zellkernes zu erkennen. An den frühen Tagen unter Serumentzug (**A,B**) sind TUNEL-positive Zellen häufig der fibroblastenähnlichen Morphologiegruppe zuzurechnen. In den Bildbeispielen für längerdauernde Serumdeprivation (**C-F**) sind hingegen deutlich mehr runde Zellen TUNEL-positiv. Es handelt sich um Bilder aus verschiedenen TUNEL-markierten Versuchen.

A – Tag 0; **B** – Tag 2 in serumfreien Medium ohne NGF; **C, D** – Tag 6 in serumfreien Medium ohne NGF; **E** – Tag 9 in serumfreien Medium ohne NGF; **F** – Tag 13 in serumfreien Medium ohne NGF

TUNEL-Markierung und Zellmorphologie

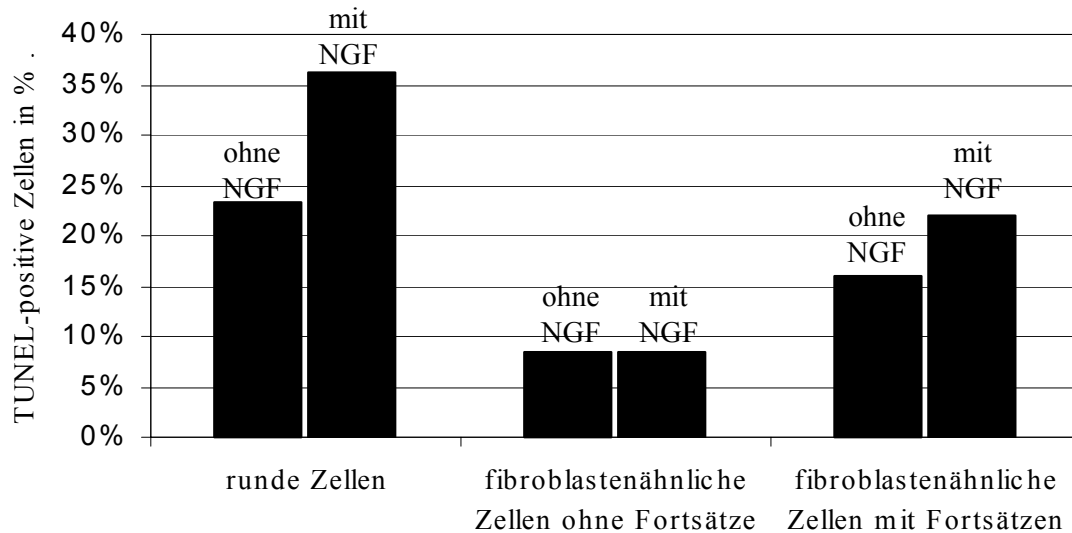


Abb. 12: Mittlerer Anteil TUNEL-positiver Zellen in den Morphologiegruppen

Eine Säule stellt den prozentualen Anteil TUNEL-positiver Zellen in einer Morphologiegruppe unabhängig von der Dauer des Serumentzuges dar. Es sind jeweils die Mittelwerte aus den Prozentsätzen am Tag 0, 2, 6, 9 und 13 der Serumdeprivation ohne und mit NGF angegeben. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten für serumfreies Medium ohne und mit NGF ($p > 0,05$). Nur in serumfreiem Medium mit NGF lässt sich mit $p < 0,05$ feststellen: Die runden Zellen sind die Morphologiegruppe mit dem höchsten Anteil TUNEL-positiver Zellen. Alle weiteren Differenzen können zufallsbedingt sein.

Zwischen den Werten für Serumentzug ohne und mit NGF existieren keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$), weshalb die Daten mit und ohne NGF zusammen betrachtet werden können. Demnach sind runde Zellen diejenigen mit der signifikant größten Fraktion TUNEL-positiver Zellen ($p < 0,05$).

In den drei Morphologiegruppen verändert sich jedoch während der Zeit des Serumentzuges der Anteil TUNEL-positiver Zellen beträchtlich. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

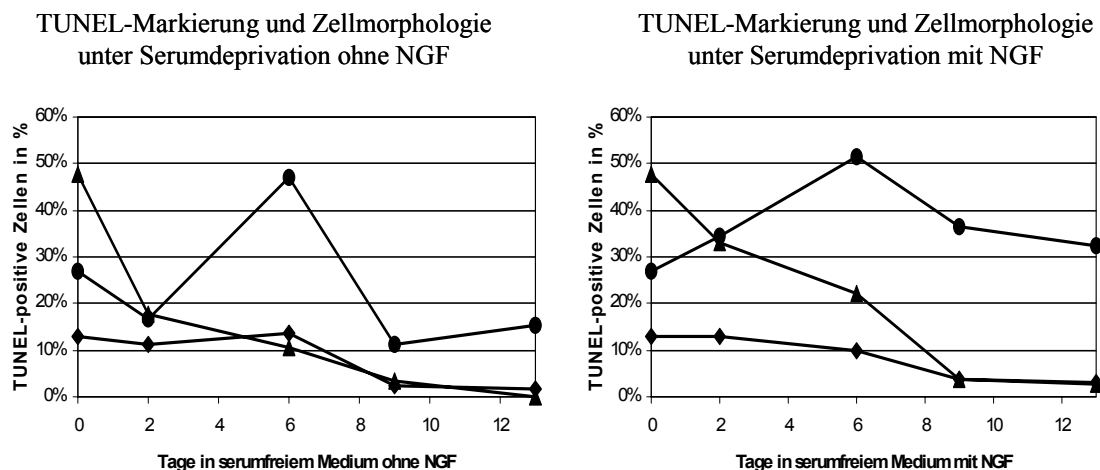


Abb. 13: Häufigkeit TUNEL-positiver Zellen während der Serumdeprivation

Abgebildet ist der Prozentsatz TUNEL-positiver 1321N1-Zellen während der Serumdeprivation ohne (links) und mit NGF (rechts). Es sind die Mittelwerte aus drei TUNEL-markierten und ausgewerteten Versuchen dargestellt. Meist ist eine abfallende Tendenz der Kurven unter fortschreitender Serumdeprivation bei relativ großen Schwankungen zwischen den einzelnen Werten zu erkennen.

●-runde Zellen, ◆-fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze, ▲-fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen

Es sind bei den im folgenden beschriebenen Häufigkeiten TUNEL-markierter Zellen keine signifikanten Differenzen zwischen Serumentzug ohne und mit NGF vorhanden.

Nach unseren Ergebnissen haben die **fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze** von Versuchsbeginn an einen nur geringen Anteil TUNEL-positiver Zellen. Am Tag 0 liegt er bei 12,8%. In serumfreiem Medium ohne NGF steigt dieser Anteil nur wenig bis Tag 6 (13,7%) und fällt auf 1,6% am Tag 13. In serumfreiem Medium mit NGF fällt er kontinuierlich über 9,9% am Tag 6 auf 3,1% bei Versuchsende.

Am Tag 0 haben die **fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen** mit 47,6% die höchste Rate TUNEL-positiver Zellen. Diese sinkt aber während der Zeit der Serumdeprivation sowohl in Medium ohne als auch mit NGF kontinuierlich ab. Ab Tag 2 in serumfreiem Medium liegt die relative Häufigkeit TUNEL-positiver Zellen in dieser Morphologiegruppe unter derjenigen für die runden Zellen. Danach nähert sie sich stark der Häufigkeit TUNEL-positiver Zellen unter den fibroblastenähnlichen Zellen ohne Fortsätze an und liegt am Tag 13 bei 0% in Medium ohne und 2,6% in Medium mit NGF.

Die Häufigkeit TUNEL-positiver Zellen unter den **runden Zellen** schwankt relativ stark. Sie beginnt am Tag 0 bei 27,1%. In serumfreiem Medium ohne NGF erreicht sie über 16,7% am Tag 2 einen Gipfel bei 46,9% am Tag 6. Nach steilem Abfall auf 11,1% am Tag 9 liegt sie am Versuchsende bei 15,4%. In serumfreiem Medium mit NGF steigt der Prozentsatz TUNEL-positiver runder Zellen kontinuierlich auf 51,4% am Tag 6 und fällt von dort bis auf 32,3% am Tag 13. Ab Tag 2 unter Serumdeprivation sowohl ohne als auch mit NGF liegen die Werte für runde Zellen über denen der beiden anderen Morphologiegruppen.

4.5 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Kaliumkanäle Kv1.3 und TASK

Neben den bisher untersuchten Parametern wurde weiterhin die Expression von Kaliumkanalproteinen mit entsprechenden Antikörpern erfasst. Beide werden bekanntermaßen in glialen Zellen exprimiert.

4.5.1 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die Kv1.3-Expression

Bei der Markierung der Zellen mit Anti-Kv1.3-Primär- und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern wird folgendes fluoreszenzmikroskopische Bild erhalten: Alle Zellformen zeigen eine feingepunktete, zytoplasmatisch lokalisierte Fluoreszenz. Dieses Bild bleibt unter Serumdeprivation ohne und mit NGF konstant. Als Beispiel hierfür wird die Abbildung 14 (A, C) angeführt.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensität der runden Zellen mit denen der fibroblastenähnlichen, stellt man einen Unterschied fest. Wie aus Abbildung 14 (E) erkenntlich, zeigen während der gesamten Versuchzeit alle runden Zellen (Bildmitte) eine etwas stärkere Markierung als die fibroblastenähnlichen Zellen (Bildrand).

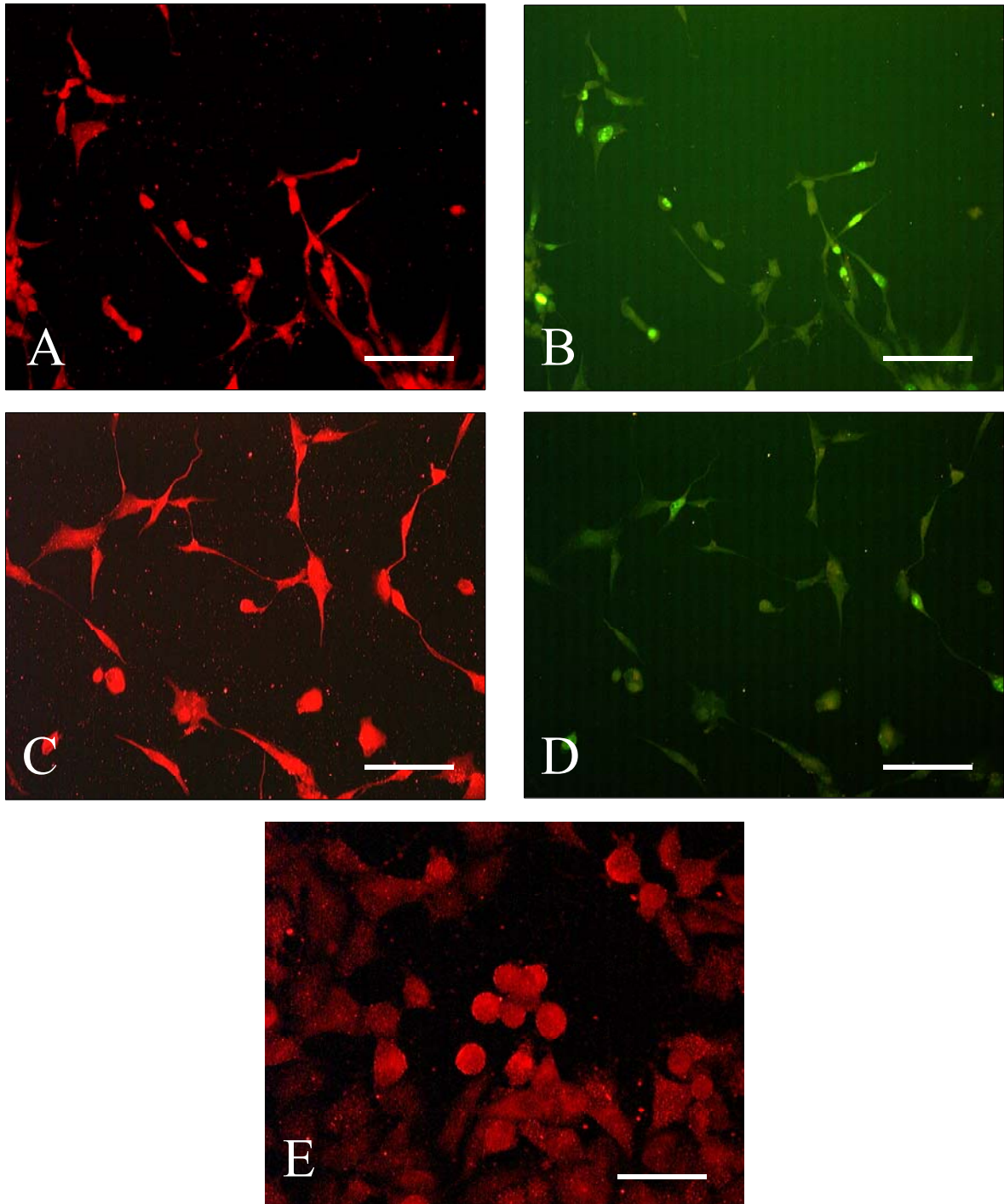


Abb. 14: Anti-Kv1.3- und Anti-Ki67-markierte 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation

A,B – 1321N1 am Tag 6 unter Serumdeprivation ohne NGF, Kv1.3- und Ki67-Doppelmarkierung, Bar = 100µm; es ist das gleiche Blickfeld in rot für Kv1.3 (**A**, Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper) und in grün für das Ki67-Antigen (**B**, Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper) dargestellt.

C,D – Tag 6 unter Serumdeprivation mit NGF, Kv1.3- und Ki67-Doppelmarkierung, Bar = 100µm; es ist das gleiche Blickfeld in rot für Kv1.3 (**C**, Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper) und in grün für das Ki67-Antigen (**D**, Cy2-gekoppelter Sekundärantikörper) dargestellt.

A-D – Alle Zellen sind Kv1.3 positiv. Nur ein Teil der Zellen ist positiv für das Ki67-Antigen.

E – 1321N1 am Tag 7 unter Serumdeprivation ohne NGF, Kv1.3-Markierung, Bar = 50µm; dargestellt ist ein typisches Bild der Kv1.3-Markierung. Die fibroblastenähnlichen Zellen (Bildränder) sind durch ihre feingepunktete, zytoplasmatische Markierung zu erkennen. Die runden Zellen (Bildmitte) fluoreszieren intensiver als die fibroblastenähnlichen.

4.5.2 Einfluss der Serumdeprivation ohne und mit NGF auf die TASK-Expression

Mittels entsprechender Antikörper wurde die Expression von TASK während der Serumdeprivation untersucht. Dabei zeigt sich im Fluoreszenzmikroskop eine fleckförmig diffuse Fluoreszenz des Zytoplasmas aller Zellen, gleich welcher Zellform und unabhängig von der Dauer der Serumdeprivation. Beispielhaft ist in Abbildung 16 (C-F) das Bild der Zellen im Fluoreszenzmikroskop nach Markierung mit Anti-Task-Antikörpern dargestellt.

Zur Validierung des von uns verwendeten Antikörpers verglichen wir das nach Anti-TASK-Markierung mit unserem Antikörper resultierende fluoreszenzmikroskopische Bild von cerebellären Körnerzellkulturen der Ratte mit den Ergebnissen von Millar et al. (2000). Ihre elektrophysiologischen und immunzytochemischen Untersuchungen führten sie unter anderem an cerebellären Körnerzellkulturen von 6-9 Tage alten Ratten durch. In diesen Zellen wird TASK-1 mRNA exprimiert. Zellen in sieben Tage alten Kulturen zeigten in der Studie von Millar et al. (2000) nach Markierung mit Anti-TASK-Antikörpern eine zytoplasmatische und membranassoziierte Fluoreszenz. Körnerzellen, welche sich hingegen nur einen Tag in Kultur befanden, waren für diesen Antikörper negativ und zeigten auch elektrophysiologisch nicht den entsprechenden Strom.

Wie in der Abbildung 15 (A-D) dargestellt, lassen sich einen Tag in Kultur befindliche Körnerzellen von embryonalen Rattenhirnen nicht durch den in unseren Versuchen benutzten Antikörper markieren. Nach acht Tagen in Kultur sind diese jedoch deutlich positiv (Abbildung 15 E,F). Mitkultivierte gliale Zellen zeigen während des gesamten Zeitraumes in Kultur eine Immunfluoreszenz für TASK (Abbildung 16 A,B). Das fluoreszenzmikroskopische Erscheinungsbild der Glia- und Körnerzellen nach längerer Kultivierung ähnelt dem von 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation (Abbildung 16 C-F).

Diese Ergebnisse bestätigen die Validität des von uns verwendeten Anti-TASK-Antikörpers und machen eine unspezifische Markierung durch diesen Antikörper unwahrscheinlich.

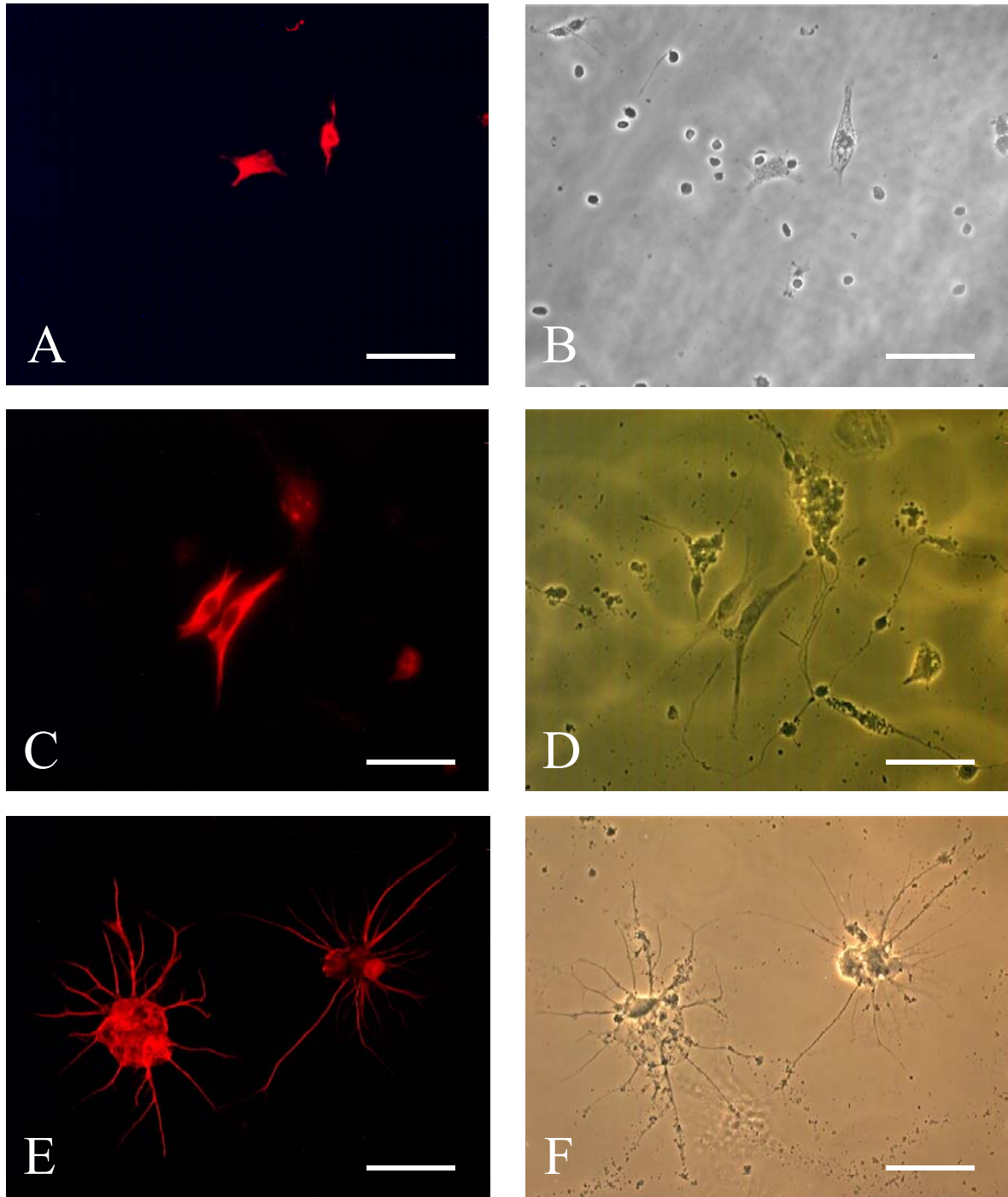


Abb. 15: Anti-TASK-markierte cerebelläre Körnerzellkulturen der Ratte

A-D – cerebelläre Körnerzellen und Astrozyten, erster Tag in Kultur, Anti-TASK-Markierung (**A,C**) und das gleiche Blickfeld im Phasenkontrast (**B,D**), Bar = 50µm; es ist das gleiche Blickfeld in roter Fluoreszenz für die TASK-Markierung (**A,C**) und im Phasenkontrastmodus (**B,D**) dargestellt. Cerebelläre Körnerzellen (rund) sind nach einem Tag in Kultur TASK-negativ, gliale Zellen (fibroblastenähnliche Morphologie, Bildmitte in **C,D**) sind TASK-positiv.

E,F – cerebelläre Körnerzellen nach acht Tagen in Kultur, Anti-TASK-Markierung (**E**) und gleiches Blickfeld im Phasenkontrast (**F**), Bar = 50µm; die cerebellären Körnerzellen sind nach acht Tagen in Kultur deutlich TASK-positiv.

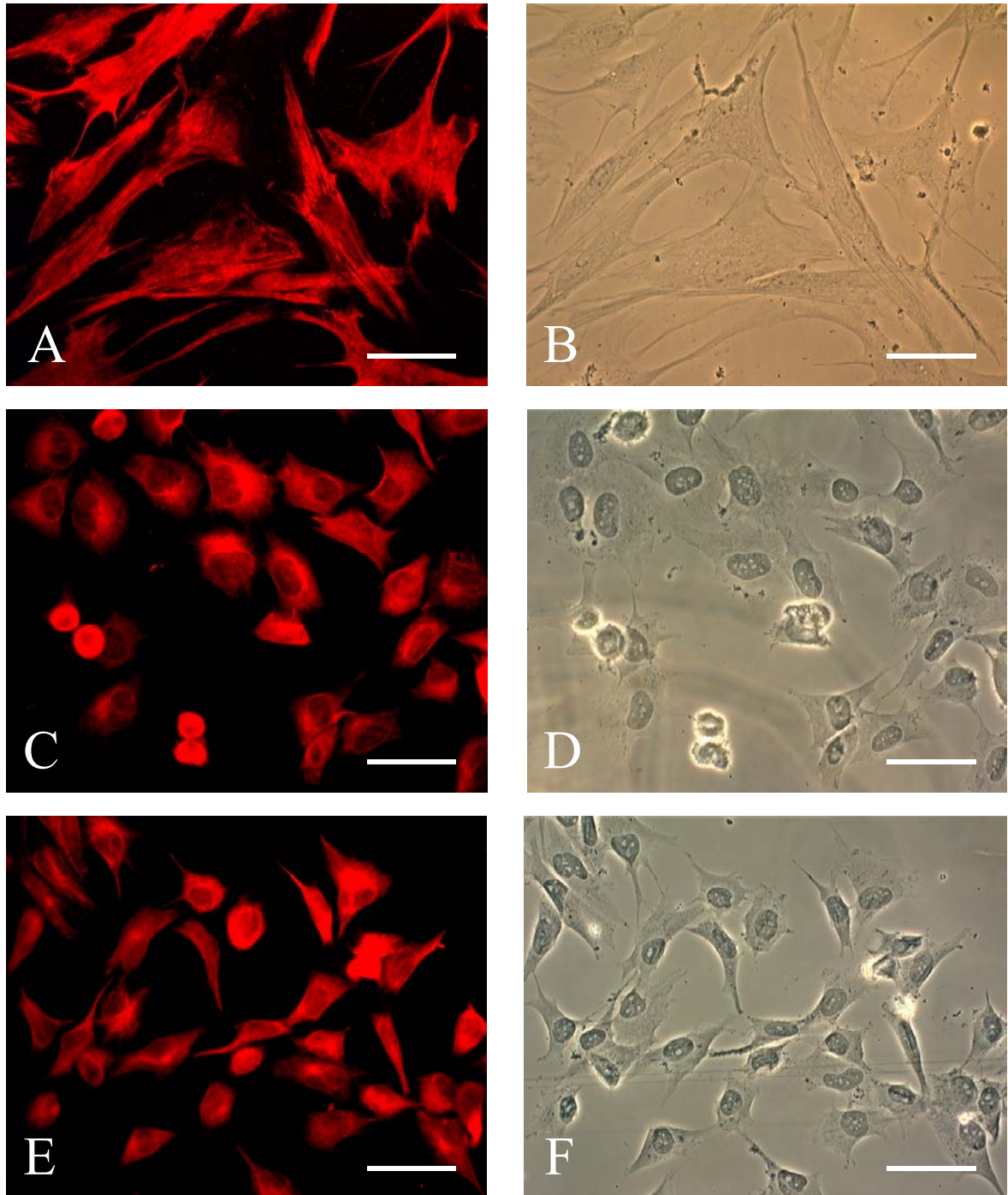


Abb. 16: Anti-TASK-markierte Glia- und 1321N1-Zellen

A,B – Astrozyten in cerebellären Körnerzellkulturen von Rattenembryonen nach acht Tagen in Kultur, Anti-TASK-Markierung (**A**) und gleiches Blickfeld im Phasenkontrast (**B**), Bar = 50µm; sämtliche Astrozyten in den Kulturen der cerebellären Körnerzellen sind TASK-positiv.

C-F – 1321N1-Zellen nach 9 Tagen unter Serumdeprivation ohne (**C,D**) und mit (**E,F**) NGF, Anti-TASK-Markierung (**C,E**) und gleiche Blickfelder im Phasenkontrast (**D,F**), Bar = 50µm; diese zwei Bildpaare sind repräsentativ für das fluoreszenzmikroskopische Bild von 1321N1-Zellen nach Anti-TASK-Markierung. Es handelt sich um eine fleckförmig diffuse Markierung des Zytoplasmas. Runde Zellen (**C**, links unten) fluoreszieren intensiver.

5 Diskussion

5.1 Neuronenähnliche Differenzierung der 1321N1-Zellen

5.1.1 Serumentzug als autokrine Stimulation

Als Ergänzung zur elektrophysiologischen Studie von Kraft et al. (2001) wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Serumdeprivation auf die humane Astrozytomzelllinie 1321N1 mit morphologischen und immunhistochemischen Methoden näher untersucht.

In Gliomen ist die Produktion von zahlreichen Wachstumsfaktoren (Westphal und Hermann 1989; Emmett et al. 1997; Singer et al. 1999; Weis et al. 1999) und Rezeptoren (Weis et al. 1999) nachgewiesen. Serumentzug in Kultur bewirkt durch Wegfall von exogen zugeführten Wachstumsfaktoren, dass sich die Zellen ihr Wachstumsmedium selbst konditionieren und dieses über die Bindung an Rezeptoren auf den Tumorzellen **autokrin wirksam** wird (Westphal und Herrmann, 1989). Manchmal kann die Produktion von bestimmten Wachstumsfaktoren an den Serumentzug gebunden sein. So zeigten beispielsweise PC12-Zellen nur in serumfreiem Medium eine NGF-Synthese (Gill et al. 1998).

Serumentzug bewirkt außerdem, dass hemmende Einflüsse von aus dem Serum stammenden Wachstumsfaktoren entfallen (Lee und Koo 1999). So konnte bei den Rattengliomzelllinien C6 und 9L eine Wirkung von NGF erst nach Serumentzug festgestellt werden (Knupfer und Arendt 2001).

Eine serumdeprivationsinduzierte NGF-Synthese ist nicht auf Tumorzellen beschränkt. Auch nach Stimulation von nicht-neoplastischen, reaktiven Astrozyten kann eine gesteigerte NGF-Sekretion beobachtet werden (Hutton und Perez Polo 1995; Roßner et al. 1997). Möglicherweise haben die transformierten Zellen diese Eigenschaft der stressinduzierten NGF-Produktion beibehalten und steigern unter Serumdeprivation die Produktion von Wachstumsfaktoren.

Durch Serumentzug konnte bei den 1321N1-Zellen eine **neuronenähnliche Differenzierung** induziert werden. Diese leitet sich aus den elektrophysiologischen Eigenschaften (erhöhte Dichte an spannungsabhängigen Natriumkanälen) und aus der veränderten Morphologie (runder Zellkörper, Ausbildung von Zellfortsätzen) ab (Kraft et al. 2001). In der hier vorliegenden Studie konnte diese Morphologie nur in

Ansätzen bestätigt werden. Dies kann methodische Gründe haben. Abweichend von den Versuchen, die Kraft et al. (2001) durchgeführt haben, haben wir pro Deckgläschen weniger Zellen ausgesät, andere Zellkulturkammern benutzt und höhere Passagen der Zelllinie verwandt. Die Abhängigkeit der Ergebnisse von den Kulturbedingungen und der Wachstumsunterlage sind allgemein bekannt (Tornatore et al. 1997). Zusätzlich kann es mit zunehmender Zeit in Kultur zum Verlust von Wachstumsfaktorrezeptoren kommen (Wang et al. 1998), der sich bei nicht identischen Kulturbedingungen unterschiedlich auswirken kann. Nachdem unsere erste Versuchsreihe gegenüber den Ergebnissen von Kraft et al. (2001) ein abweichendes Resultat gezeigt hat, haben wir daher mit einer neuen Charge von 1321N1-Zellen gearbeitet. Diese zeigten jedoch unter Serumdeprivation das gleiche Verhalten wie die vorher untersuchten. Obwohl sich in unserer Studie die neuronenhähnliche Differenzierung der Gliomzellen nicht in der Form zeigte wie erwartet, werten wir die tendenziellen morphologischen Veränderungen als hinreichendes Indiz dafür.

Nicht alle Studien an Gliomzellen beschreiben eine veränderte Morphologie zugunsten runder Zellformen. Ausdifferenzierte Ratten-T9-Gliomzellen, bei denen durch Serumentzug nur schwache morphologische Veränderungen induziert werden konnten, zeigten eine fibroblastenähnliche Morphologie mit lamellos-filamentös-verzweigten Fortsätzen, runde Zellen wurden nicht beschrieben (Marushige et al. 1987). Beobachtungen an C6-Rattengliomzellen (Colangelo et al. 1994) ergaben eine NGF-induzierte Verlängerung der Zellfortsätze und eine Reduktion der Anzahl „flacher Zellen“, welche in unseren Versuchen der Morphologiegruppe „fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze“ entsprechen könnte. Colangelo et al. (1994) beobachteten diese Empfindlichkeit der C6-Zellen erst nach Transfektion mit *trkA*-cDNA. Kumar et al (1990) und Watanabe et al. (1999) stellten abweichend hiervon eine Empfindlichkeit nichttransfizierter C6-Zellen gegenüber NGF fest.

Ferner existiert eine Studie, in der bei einer Primärkultur eines Glioblastoms nach Serumdeprivation zwar rundliche Zellformen auftraten, diese jedoch in Clustern wuchsen (Lombardi et al. 2002). Bei ihnen sank die GFAP-Immunreaktivität und die Expression von Neurofilamenten nahm zu, was eine neuronale Differenzierung belegt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die morphologische Änderung von Gliomzellen bei autokriner Stimulation durch Serumentzug einer großen Schwankungsbreite unterliegt. Dabei ist die Morphologie sicher kein „hartes“ Kriterium, um Zelldifferenzierung ausreichend charakterisieren zu können.

5.1.2 Serumentzug und zusätzliche NGF-Gabe

Es ist bekannt, dass Gliomzellen NGF sezernieren. Dies konnte für C6-Gliomzellen der Ratte (Murphy et al. 1977; Obara et al. 1999b) sowie die humanen Astrozytomzelllinien 1321N1 (Obara et al. 1999a), A172 (Hamel et al. 1993) und U251 (Kokunai et al. 1999) gezeigt werden. Zieht man in Betracht, dass Gliomzell-konditioniertes Medium und NGF-haltiges Medium bei anderen Zellen (PC12-Zellen) eine neuronale Differenzierung verursachen kann, so besteht auch in Gliomzellen grundsätzlich die Möglichkeit einer neuronenähnlichen Differenzierung durch NGF. Insofern waren morphologische Veränderungen wie im vorherigen Kapitel nicht nur alleine durch Serumentzug, sondern auch nach Gabe von NGF zu erwarten. Wir mussten allerdings auch hier feststellen, dass sich die Befunde von Kraft et al. (2001) nur in Ansätzen bestätigten. Insbesondere ergaben sich keine Unterschiede in der Morphologie zwischen Serumentzug allein und Serumentzug mit NGF-Gabe, während Kraft et al. (2001) eine (wenngleich geringe) zeitliche Vorverlagerung der morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen durch NGF feststellten. Deutlicher waren die Befunde bei der T9-Gliomzelllinie, bei der durch NGF erst das volle Maß der morphologischen Veränderungen (Fortsatzwachstum, Zellbrücken) erreicht werden konnte (Marushige et al. 1987). Auch an (trkA-transfizierten) C6-Zellen konnte durch NGF-Gabe eine deutliche neuronale Differenzierung ausgelöst werden (Colangelo et al. 1994; Pflug et al. 2001). In der gleichen Richtung sind die Befunde zu interpretieren, die Watanabe et al. (1999) erhoben. Sie wiesen bei C6-Zellen zwar schon eine für das Überleben der Zellen wichtige endogene NGF-Wirkung nach, jedoch zeigte exogen zugeführtes NGF noch eine zusätzliche Wirkung. Dem entsprechen auch die Beobachtungen von Kokunai et al. (1999) an der humanen Gliomzelllinie U251.

In unseren Versuchen sind keine Differenzen zwischen der Kultivierung in serumfreiem Medium ohne und mit NGF deutlich geworden. Das könnte auf eine vollständige Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden durch das endogen produzierte NGF hindeuten und erklären, warum eine exogene NGF-Gabe eine eher geringe (Kraft et al. 2001) oder keine Wirkung (unsere Experimente) mehr zeigt.

Bis jetzt wurde die Morphologie als einziger Differenzierungsparameter betrachtet. Dieser lässt aber nur sehr unsichere Rückschlüsse auf zellbiologische Prozesse wie eine Differenzierung zu. So ist das Entstehen von Fortsätzen an PC12- und Neuroblastomzellen, besonders unter Neurotrophinbehandlung zwar ein deutlicher Hinweis auf eine Entwicklung in Richtung Neuron (Greene und Tischler 1976 und 1982; Matsushima und

Bogenmann 1993; Poluha et al. 1995; Bogenmann et al. 1998), allerdings können auch andere, nicht neuronale Differenzierungsrichtungen durch das Entstehen von längeren Fortsätzen gekennzeichnet sein (Greene und Kaplan 1995). Da das Fortsatzwachstum bei C6-Gliomzellen mit der ansteigenden Expression von einem neuronalen (neuronenspezifische Enolase) und mehreren oligodendroglialen Markern (A2B5, Phosphodiesterase) verbunden war, wurde hier von Pflug et al. (2001) eine eher oligodendrogliale Differenzierung vermutet. Demnach ist es wichtig, die morphologischen Parameter nicht isoliert, sondern zusammen mit anderen zellbiologischen Veränderungen zu betrachten (siehe Kapitel 5.2).

5.1.3 NGF-Rezeptoren auf 1321N1-Zellen

Mit den vorliegenden Experimenten konnte eine **trkA-Immunreaktivität** für alle 1321N1-Zellen vor und während der gesamten Zeit des Serumentzuges nachgewiesen werden. Ein vergleichbarer Befund wurde von Singer et al. (1999) erhoben, wobei andere Arbeiten ein Fehlen von trkA-Rezeptoren auf Gliomzellen zeigten (Hamel et al. 1993; Colangelo et al. 1994; Kokunai et al. 1999). Bei C6-Rattengliomzellen wurde eine trkA-mRNA-Expression und NGF-Sensibilität nachgewiesen (Kumar et al. 1990; Hutton et al. 1992), während dies Colangelo et al. (1994) nicht bestätigen konnten. Wang et al. (1998) wiesen nach, dass Gliome in vivo trk-Rezeptoren exprimieren, diese aber nach einiger Zeit in vitro verlieren, weshalb den trkA-Rezeptoren nach diesen Autoren nur eine untergeordnete Bedeutung für das Überleben der Gliomzellen in Kultur zukommen könne. Die Untersuchungen zeigen, dass die Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren einer großen Schwankungsbreite unterliegt. Auch innerhalb einer Zelllinie konnte dies beobachtet werden (Kumar et al. 1990; Hutton et al. 1992; Colangelo et al. 1994). Bemerkenswert ist, dass in unserer Studie trkA bereits am Tag 0, also auch in serumhaltigem Medium, vorhanden ist. Deshalb ist anzunehmen, dass die Expression dieser Rezeptoren sehr wahrscheinlich eine konstitutive Eigenschaft der 1321N1-Zellen darstellt.

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine zytoplasmatische trkA-Immunpositivität, während eine membranassoziierte Färbung fehlte. Es ist bekannt, dass trkA-Rezeptoren für die NGF-Internalisierung wichtig sind. Dabei werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe aus trkA und NGF durch Endozytose in das Zellinnere aufgenommen (Hutton und Perez Polo 1995). Dieses Phänomen ist bei PC12- und neuronalen Zellen in vitro gut untersucht

(Grimes et al. 1996 und 1997; Meyer-Franke et al. 1998). Leider konnten wir zur Absicherung unserer trkA-Immunhistochemie keine Immunogold-Elektronenmikroskopie und Westernblot-Untersuchungen durchführen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nur für einen Teil der 1321N1-Zellen eine **p75-Immunreaktivität** nachgewiesen. Aus der Literatur ließen sich keine genauen Prognosen bezüglich der zu erwartenden p75-Expression aufstellen. Es scheinen in vivo und in vitro nur bei einem Teil der Gliome p75-Rezeptoren vorzukommen (Tanaka et al. 1998). Mittels immunhistochemischer Verfahren konnten an glialem Tumorgewebe verschiedene Grade der p75-Rezeptorexpression nachgewiesen werden. Das p75-Protein war jeweils nur bei einem Teil der Gliomzellen vorhanden. Es fanden sich Astrozytome, die den p75-Neurotrophinrezeptor nicht exprimierten, und solche mit über 90% p75-immunreaktiver Zellen (Prior et al. 1989; Tanaka et al. 1998). Andere Studien berichten über kleine bis moderate Fraktionen p75-immunpositiver Zellen (Chandler et al. 1984; Kumar et al. 1990; Kato et al. 1995).

Anhand der hier vorgelegten Daten konnte erstmals durch die morphologiebezogene Auswertung der immunzytochemischen Markierungen einer humanen Astrozytomzelllinie ein **Zusammenhang zwischen der p75-Expression und der Zellmorphologie** hergestellt werden. Je nach Zellform zeigten sich im Fluoreszenzmikroskop zwischen 41,9% und 11,6% der Zellen p75-immunreaktiv. Die Gruppe der runden Zellen enthielt unter Serumdeprivation den signifikant höchsten Anteil p75-positiver Zellen (Abbildung 5). Inwiefern bei diesen Zellen ein Zusammenhang zwischen p75-Positivität und anderen Parametern (Apoptose, Proliferation) besteht, wird weiter unten diskutiert.

Als Beispiele einer p75-Rezeptor-vermittelten morphologischen NGF-Wirkung sind ein Fortsatzwachstum bei T9-Gliomzellen (Dobrowsky et al. 1994) und eine oligodendrogliale Differenzierung nach stabiler trkA-Transfektion bei C6-2B-Gliomzellen (Colangelo et al. 1994) zu nennen. Ohne weitere Untersuchungen ist es nicht möglich sicher festzustellen, ob die Morphologieänderung in unseren Experimenten tatsächlich durch p75, durch trkA oder durch beide Rezeptoren verursacht wurde. Ferner ist nicht ausgeschlossen, dass die Änderung der Morphologie p75- und trkA-unabhängig ist, da das Vorhandensein von p75- und trkA-Rezeptoren in vitro kein zwingendes Zeichen für eine Sensibilität gegenüber NGF darstellt. Die drei von Singer et al. (1999) untersuchten Glioblastomzelllinien, welche wie die 1321N1-Zellen sowohl p75 als auch trkA

exprimierten, zeigten unter Serumentzug und NGF-Gabe keine morphologischen Veränderungen. Aufgrund unseres Ergebnisses, dass die runden Zellen den höchsten Anteil p75-positiver Zellen aufwiesen, kann man jedoch spekulieren, dass NGF durch den p75-Rezeptor eine derartige Morphologie induziert (ungeachtet anderer Wirkungen, z.B. der Induktion einer fibroblastenähnlichen Morphologie). Ein derartiger Zusammenhang lässt sich für trkA, der von allen Zellen gleichermaßen und zu allen Zeitpunkten in Kultur gleich stark exprimiert wurde, nicht ableiten.

Analog zur Frage, ob die Serumdeprivation bzw. NGF die Morphologieänderung über p75 und / oder trkA bewirkt, können wir uns nur spekulativ dazu äußern, ob die p75-Expression tatsächlich neurotrophinabhängig ist, d.h. ob sie durch NGF unmittelbar induziert wird. Hinweise auf eine derartige **neurotrophinabhängige Expression der NGF-Rezeptoren** lassen sich bei der C6-Rattengliomzelllinie finden. Durch NGF-Gabe ließ sich dort die Expression der p75-mRNA sowie des p75-Rezeptorproteins deutlich steigern (Hutton et al. 1992; Spoerri et al. 1992). Ohne NGF waren die Rezeptoren hauptsächlich auf der Zelloberfläche lokalisiert, mit NGF kamen sie vermehrt in Vesikeln und im glatten endoplasmatischen Retikulum, also intrazellulär vor (Spoerri et al. 1992).

Nach den hier vorgelegten Daten sind zumindest auf einem Teil der 1321N1-Zellen sowohl trkA- als auch p75-Rezeptoren vorhanden. Somit sollten auch einige Gesichtspunkte der **Interaktion zwischen trkA und p75** betrachtet werden. Schon länger bekannt ist, dass bei der Koexpression von p75- und trkA-Proteinen im Gegensatz zur isolierten Wirkvermittlung durch den trkA-Rezeptor der maximal erreichbare Effekt durch beide Rezeptoren wesentlich höher liegt (Bredesen und Rabizadeh 1997). Als Ursache kann man die wahrscheinlich nur in Anwesenheit beider Rezeptoren gebildeten „high affinity binding sites“ ansehen. Diese scheinen nicht nur die deutlichsten Wirkungen zu vermitteln, durch sie haben sogar kleinste NGF-Konzentrationen erkennbare Effekte. Auch aus diesem Grund sollten Reaktionen der von uns untersuchten Zelllinie am deutlichsten an den Zellen mit der häufigsten Expression des p75-Rezeptors, also den runden Zellen, erkennbar sein. Vielleicht wies aus den eben geschilderten Gründen diese Morphologiegruppe die niedrigste Proliferationsrate unter autokriner Stimulation auf (siehe unten).

Entscheidend für die eintretende Wirkung der Neurotrophine ist auch das numerische Verhältnis der Rezeptoren zueinander (Kaplan und Miller 1997). So können je nach Expressionsstärke der einzelnen Rezeptoren teils entgegengesetzte Wirkungen, zum Beispiel Apoptoseinduktion oder Überleben durch NGF bewirkt werden. Dies liegt zum

Teil in einigen antagonistischen Wirkungen zwischen beiden Rezeptoren begründet. So kann der p75-Rezeptor über den Sphingomyelinase-Ceramid-Weg die Signalweiterleitung durch den trkA-Rezeptor hemmen (Mac Phee und Barker 1997). P75-exprimierende 1321N1-Zellen könnten demnach einige NGF-Wirkungen stärker, andere hingegen weniger ausgeprägt oder gar nicht zeigen.

5.2 Wie verändern sich andere tumorbiologische Parameter unter Serumentzug ohne und mit NGF-Gabe?

5.2.1 Proliferation der 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation ohne und mit NGF

Um eine Aussage über die proliferative Aktivität der 1321N1-Zellen unter Serumentzug treffen zu können, verwendeten wir die Anti-Ki67-Markierung. Sie stellt die proliferativ aktive Fraktion der 1321N1-Zellen durch eine positive Markierung der Kerne dar (Gerdes und Schlüter 1991; Schlüter et al. 1993; Alkiza et al. 2000). Alkiza et al. (2000) erkannten sie als sinnvollen prognostischen Parameter bei der Diagnostik von Gliomen.

Sehr deutlich ist an den hier vorgelegten Ergebnissen der Proliferationsrückgang während der Zeit des Serumentzuges zu erkennen. Sowohl unter Serumdeprivation ohne, als auch mit NGF kommt es zu diesem Rückgang der proliferativen Aktivität (Abbildung 10). Das Absinken der Proliferation war in allen Morphologiegruppen gleich stark, es gab also keine Zellpopulation, die durch ein besonderes Wachstumsverhalten charakterisiert war.

Ein Rückgang der Proliferation war in allen Morphologiegruppen – wenngleich von unterschiedlichen Ausgangswerten und in unterschiedlichem Maß – zu verzeichnen. Dies lässt eine ähnliche Ausstattung mit proliferationsrelevanten Proteinen vermuten. Hinweise auf eine Beziehung zur **Proliferation** lassen sich für **trkA** finden, da dieser Rezeptor in allen Morphologiegruppen gleich stark nachgewiesen werden konnte. Der durch trkA vermittelte proliferationshemmende Effekt von NGF wurde bereits in zwei Gliomzelllinien (C6-2B- und U251-Gliomzellen) nachgewiesen. Dort war er erst nach trkA-Transfektion zu beobachten (Kokunai et al. 1999; Pflug et al. 2001). Deshalb kann man annehmen, dass der trkA-Rezeptor entscheidend für die Signalweiterleitung ist.

Auffallend ist allerdings in unserer Arbeit, dass die trkA-Expression in den Zellen immer konstant war, es gab zwischen der Stärke der Immunreaktivität am Tag 0 und an den darauffolgenden Tagen keinen Unterschied. Spielt trkA tatsächlich für die Signalvermittlung bei Proliferation eine direkte Rolle, hätte man vielleicht erwartet, dass die Expression je nach Zeit in Kultur unterschiedlich ist. Zieht man in Betracht, dass trkA wahrscheinlich die Proliferation hemmt, hätte anfangs eine geringere Expression erwartet werden können, welche dann - entsprechend dem Absinken der Proliferationskurve - unter Serumdeprivation ansteigt. Insofern ergibt sich bei uns alternativ die Möglichkeit, dass trkA zum konstitutiven Expressionsprofil der 1321N1-Zelllinie gehört und bezogen auf die Proliferationshemmung keine Rolle spielt.

Ferner lassen sich Arbeiten finden, die einen proliferationssteigernden Effekt auf Glioblastomzelllinien nachgewiesen haben (Engebraaten et al. 1993; Oelmann et al. 1995; Singer et al. 1999). Bei einem Teil dieser Experimente konnte die NGF-Wirkung auf die Zellen durch den Tyrosinkinaseinhibitor K252 aufgehoben werden. Da trkA eine durch Liganden aktivierte Rezeptortyrosinkinase darstellt, wird diese NGF-Wirkung wahrscheinlich durch trkA vermittelt. An C6-Zellen existieren sehr abweichende Daten, einmal über Proliferationshemmung (Pflug et al. 2001), zum anderen über eine Steigerung der H₃-Thymin-Aufnahme (Colangelo et al. 1994) nach NGF-Gabe. Eine genaue Aussage über die Beziehung des trkA-Rezeptors zur Proliferation der 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation lässt sich aus unseren Daten zusammenfassend nicht ableiten.

Die Proliferationsrate war in unserer Studie in den verschiedenen Morphologiegruppen unterschiedlich. Daher sind Faktoren anzunehmen, welche auf die einzelnen Zellformen unterschiedlich stark einwirkten. Die höchste Fraktion Ki67-positiver Zellen wiesen die fibroblastenähnlichen Zellen mit Fortsätzen auf (Abbildung 8). Die runden Zellen zeigten die geringste Wachstumsrate und bemerkenswerterweise zugleich den höchsten Anteil p75-Rezeptor-positiver Zellen. Das könnte ein Zeichen des **proliferationshemmenden Einflusses des p75-Rezeptors** sein und im Einklang mit einer durch ihn mitverursachten Differenzierung stehen. Das entspricht den Ergebnissen an T9-Gliomzellen, bei welchen der Proliferationsrückgang auf eine p75-vermittelte Differenzierung der Zellen unter NGF-Behandlung zurückgeführt werden konnte (Marushige et al. 1987; Dobrowsky et al. 1994).

Eine **heterogene Zellantwort** im Hinblick auf die Wachstumshemmung durch NGF wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen gefunden. Viores und Köstner (1980) beobachteten eine einen Tag andauernde Wachstumshemmung durch NGF. Da die Proliferation aber nur für 24 Stunden gehemmt wurde, nahmen sie an, dass nur eine empfindliche Subpopulation der Zellen durch NGF im Wachstum gehemmt wird. Singer et al. (1999) beobachteten eine ähnliche Heterogenität der Reaktion von Glioblastomzellen in einer Kultur auf NGF-Gabe. Allerdings stellte er keine Proliferationshemmung, sondern eine Steigerung der H_3 -Thymidinaufnahme durch NGF fest. Diese Autoren fanden eine schnell und eine langsam proliferierende Population in den von ihnen untersuchten Zelllinien. Es konnte im Gegensatz zu unseren Ergebnissen jedoch keine Korrelation zwischen der trkA- bzw. p75-Rezeptorexpression und einer NGF-induzierten Proliferationssteigerung gefunden werden.

Zusammenfassend können wir bei 1321N1-Zellen eine Proliferationshemmung nach Serumentzug mit und ohne NGF-Gabe feststellen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Wachstumshemmung partiell durch den p75-Rezeptor vermittelt wird. Die Bedeutung des trkA-Rezeptors ist diesbezüglich nicht klar.

5.2.2 Apoptoserate der 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation ohne und mit NGF

Durch Markierung der 1321N1-Zellen mit der TUNEL-Reaktion werden DNA-Strangbrüche dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die relative Anzahl der TUNEL-positiven Zellen auf die Apoptoserate geschlossen. Auch wenn die TUNEL-Methode hauptsächlich apoptotische Zellen markiert, kann letztlich nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass nekrotische Zellen ebenfalls markiert werden, da in späten Stadien der Nekrose ähnlich dem programmierten Zelltod DNA-Fragmentationen auftreten können (Rink et al. 1995; Newcomb et al. 1999). Rink et al. (1995) begegneten diesem Problem, indem sie TUNEL-positive Zellen nach morphologischen Parametern in eher nekrotische (ursprüngliche Zellform, ungleichmäßige Anfärbung hauptsächlich des Zytoplasmas, schwächere Markierung des Zellkernes, ultrastrukturelle Zeichen der Nekrose) und eher apoptotische Zellen (kleine runde Zellen, kondensierte, runde, oft schon fragmentierte Kerne, intensiv markierte Kerne beziehungsweise Kernfragmente) unterteilten. Diese Einteilung bezog sich allerdings auf Neurone in Gewebsschnitten. Trotz

des prinzipiell für alle eukaryontischen Zellen gleichen Ablaufes des programmierten Zelltodes, ist diese Methode nicht ohne weiteres auf die Gliomzellkultur übertragbar. Zum Beispiel könnten sich morphologische Veränderungen, wie sie im Gewebe typisch sind, in Kultur anders präsentieren. Etwas vereinfachend wurden in der vorliegenden Untersuchung analog zu anderen Arbeiten (Gavrieli et al. 1992) alle TUNEL-positiven Zellen dem programmierten Zelltod zugeordnet.

Bisher wurden verschiedene Beobachtungen über die Beziehungen der trkA- und p75-Rezeptoren zum natürlich auftretenden Zelltod gemacht (Kaplan und Miller 1997; Barker 1998; Bibel und Barde 2000). So wurden unterschiedliche Theorien aufgestellt, welcher der beiden Rezeptoren unter bestimmten Bedingungen Apoptose auslöst oder verhindert. Der trkA-Rezeptor ist derjenige von beiden, welcher nach NGF-Aktivierung in den meisten Fällen das Überleben von Zellen sichert. Das wurde durch viele Studien an trkA-exprimierenden Neuronenpopulationen bestätigt (Barbacid 1994; Snider 1994; Snider und Wright 1996; Kaplan und Miller 1997). Ob dieser Rezeptor für die Vermittlung der überlebensfördernden NGF-Wirkung in C6- und 9L-Rattengliomzellen von Bedeutung ist, ist nicht geklärt (Knupfer und Arendt 2001). Es gibt allerdings auch Anzeichen einer apoptoseinduzierenden Wirkung des trkA-Rezeptors in Medulloblastomen (Kaplan und Miller 1997; Muragaki et al. 1997).

Über die Beziehung von trkA zur Apoptose in 1321N1-Zellen können wir durch unsere Untersuchung keine Aussage treffen. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass trkA von allen Zellen gleichermaßen exprimiert wurde und sich eine Unterteilung in Zellen mit einer hohen und niedrigen Apoptoserate nicht ergab.

Da die p75-positiven Zellen in den einzelnen Morphologiegruppen jedoch unterschiedlich häufig auftraten, kann für diesen Rezeptor eine Verbindung zwischen natürlichem Zelltod, Rezeptorexpression und Wirkung hergestellt werden. Allerdings sind die Beziehungen des p75-Rezeptors zur Apoptose relativ kompliziert. Dies liegt daran, dass sich die Hauptwirkungen des p75-Rezeptors von Gewebe zu Gewebe drastisch unterscheiden können. Deshalb fällt es schwer, einheitliche Muster der p75-Wirkungen speziell in Bezug auf die Apoptose zu finden. Aus diesem Grunde sollen vor Betrachtung der TUNEL-Ergebnisse in den Zellgruppen die bisher veröffentlichten Daten über p75-abhängige Apoptose in drei Kategorien zusammengefasst werden (modifiziert nach Barker 1998; Bibel und Barde 2000):

- p75 kann in Koexpression mit trkA durch NGF vor Apoptose schützen. Apoptose wird dann ausgelöst, wenn der gemeinsame Agonist fehlt. Es wird dann von einer ligandenunabhängigen Induktion des programmierten Zelltodes durch p75 gesprochen (Bredesen und Rabizadeh 1997). Solche Beobachtungen wurden unter anderem für PC12-Zellen dokumentiert (Barrett und Georgiou 1996).
- Andere Arbeiten, zum Beispiel an kultivierten Rattenoligodendrozyten, berichten hingegen über eine ligandenabhängige Apoptoseinduktion des p75-Neurotrophinrezeptor (Casaccia-Bonnel et al. 1996; Frade et al. 1996; Yoon et al. 1998). Dabei kommt es erst nach Aktivierung durch den Liganden NGF zur Induktion des natürlichen Zelltodes. Diese Beobachtungen wurden größtenteils an Zellen erhoben, welche nur p75, aber nicht trkA exprimierten. Sie wird deshalb als eine der wichtigsten trk-unabhängigen Wirkungen des p75-Rezeptors bezeichnet (Greene und Kaplan 1995).
- Zellen, welche eine p75-Überexpression aufweisen, zeigen ohne NGF eine hohe Apoptoserate, welche durch Behandlung mit diesem Neurotrophin verhindert werden kann (Rabizadeh et al. 1993). Hier zeigt sich die Induktion des programmierten Zelltodes als eine konstitutive Eigenschaft von p75, welche durch den Liganden NGF unterdrückt werden kann. In diesem Fall handelt sich wiederum um eine ligandenunabhängige p75-Wirkung.

In der vorliegenden Untersuchung wies die Morphologiegruppe der runden Zellen in serumfreiem Medium mit NGF die höchste Apoptoserate auf. Runde Zellen besaßen auch den höchsten Anteil an P75-Positivität. Die höchste Apoptoserate trat in 1321N1-Zellen also zusammen mit der häufigsten Expression des p75-Rezeptors auf. Angesichts der in jeder Zelle vorhandenen trkA-Expression, passt dieses Ergebnis auf den ersten Blick nicht zu einem der drei oben erwähnten Mechanismen. Allerdings wurden ähnliche Beobachtungen schon von Yamaguchi et al. (1998) gemacht. Diese Autoren untersuchten die Wirkung von PPF (Propentofylline) auf humane Gliomzelllinien. Zwei dieser Zelllinien exprimierten sowohl p75- als auch trkA-Rezeptoren (Singer et al. 1999). PPF erhöhte die Apoptoserate der Gliomzellen, was Yamaguchi et al. (1998) der Stimulation des NGF / p75-Systems zuordneten. In unserer Arbeit handelt es sich somit vermutlich - zumindest bei einem Teil der Zellen - um eine ligandenabhängige Apoptoseinduktion durch p75. Neben den drei oben erwähnten Möglichkeiten der Apoptoseinduktion durch p75 scheint auch das numerische Verhältnis zwischen den p75- und trkA-Rezeptoren von

Bedeutung zu sein. Je nach Expressionsstärke des einen Rezeptors stehen dessen Wirkungen im Vordergrund und fördern beziehungsweise hemmen die Effekte des anderen (Kaplan und Miller 1997). So lassen sich auch die verschiedenen Wirkungen der Neurotrophine erklären. Das numerische Verhältnis der beiden Rezeptoren kann allerdings durch die von uns durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen nicht genauer beschrieben werden.

Eine sichere Beziehung zwischen den Neurotrophinrezeptoren und dem Auftreten des natürlichen Zelltodes in der 1321N1-Zellkultur kann durch die vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. Es gibt jedoch Hinweise auf die Beeinflussung dieses Prozesses durch den p75-Rezeptor.

5.2.3 Expression von Kv1.3 und TASK

Durch immunzytochemische Analyse wurde in 1321N1-Zellen die Expression von zwei Kaliumkanälen, Kv1.3 und TASK erfasst. Diese beiden Kanäle erlaubten einen Vergleich mit den elektrophysiologischen Untersuchungen an 1321N1-Zellen nach Serumentzug und NGF-Gabe (Kraft, nicht veröffentlicht). Es wurde eine Veränderung der Dichte von spannungsgesteuerten und passiven Kaliumströmen in Abhängigkeit von der Zeit unter Serumdeprivation gemessen. Diese könnten durchaus durch Kv1.3 beziehungsweise TASK mitbestimmt werden. Die Färbung mit Anti-Kv1.3- und Anti-TASK-Antikörpern ergab eine für alle Zellen positive Markierung, welche während der Zeit unter Serumdeprivation sowie unter Zugabe von NGF konstant blieb. Demnach können die von Kraft et al. (nicht veröffentlicht) beobachteten Veränderungen der passiven und spannungsgesteuerten Kaliumströme mit den von uns verwendeten Methoden nicht auf eine Variabilität der TASK- beziehungsweise Kv1.3-Expression unter Serumdeprivation zurückgeführt werden.

Ein Verbindung von Kv-Kanälen zu Differenzierungsprozessen von Schwann-Zellen und Astrozyten ist bekannt. Es zeigte sich, dass auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kv-Kanalfamilie) dabei herunter- und einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kir-Kanäle) heraufreguliert werden (Sobko et al. 1998, MacFarlane und Sontheimer 2000a). Eine sehr hohe Aktivität von Kv1.3-Kanälen ist für den aktivierten proliferativen Zustand von T-Lymphozyten und Mikroglia typisch (Spencer et al. 1993; Szabo et al. 1996 und 1997; Chung und Schlichter 1997; Khanna et al. 1999; Kotecha und Schlichter 1999). Bestimmte humane Leukämiezellen (THP-1-Zellen) zeigen eine noch stärkere Expression dieses Kanals, welche jedoch bei Ausdifferenzierung und

Proliferationsrückgang dieser Zellen deutlich reduziert wird (DeCoursey et al. 1996). Es wäre deshalb ein Rückgang der Kv1.3-Fluoreszenz unter der durch Serumdeprivation auftretenden Differenzierung der 1321N1 möglich gewesen. Allerdings ist dieser Kanal nur einer von vielen Subtypen der Kv-Kanäle. Interessant wäre weiterhin die Untersuchung des Kv1.5-Kanals. Für ihn konnte ebenfalls eine Beziehung zu verschiedenen Entwicklungsprozessen sowie zur Proliferation glialer Zellen nachgewiesen werden (Roy et al. 1996; Attali et al. 1997; Jou et al. 1998; Kotecha und Schlichter 1999; Schmidt et al. 1999; Mac Farlane und Sontheimer 2000a). Dieser Kanal scheint zumindest in Rattenmikroglia ein zum Kv1.3 gegenläufiges Expressionsmuster aufzuweisen (Kotecha und Schlichter 1999). Leider stand kein entsprechender Antikörper zur Untersuchung von Kv1.5 in 1321N1-Zellen zur Verfügung.

Eine Beteiligung der von uns untersuchten Kanäle an den sich verändernden elektrophysiologischen Eigenschaften der 1321N1 unter Serumdeprivation kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Da nicht alle Ionenkanalproteine glialer Zellen in der aktiven Form, sondern auch in ruhender, beziehungsweise „maskierter“ Form vorliegen können (Bordey und Sontheimer 1998b), ist es möglich, dass Kraft et al. (nicht veröffentlicht) Unterschiede in der Aktivität von Kaliumkanälen mittels elektrophysiologischen Methoden gefunden haben, wir jedoch auf der Proteinebene nicht.

Ferner ist bekannt, dass Kv1.3 stark durch Phosphorylierungsprozesse beeinflusst wird (Holmes et al. 1996; Szabo et al. 1996; Chung und Schlichter 1997; Fadool et al. 2000). Dies könnte ebenfalls zu einer veränderten, nur elektrophysiologisch erfassbaren Aktivierung führen, die sich auf der Proteinebene nicht widerzuspiegeln braucht.

Die Regulierung der Ionenkanäle ist sehr vielfältig und umfasst noch wesentlich mehr Möglichkeiten: Akhtar et al. (1999) zeigten eine bei der Reaktivierung von Rattenastrozyten neue, in den ruhenden Astrozyten nicht auftretende, β -Untereinheit eines Kv-Kanals. Dieses durch alternatives Splicen entstandene Protein kommt auch in C6-Gliomzellen vor. Es führt zur Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften anderer von diesen Zellen exprimierter Kv-Kanäle und bedingt zum Teil die unterschiedlichen elektrophysiologischen Charaktere ruhender und reaktiver Rattenastrozyten, sowie von C6-Rattengliomzellen.

Bei TASK könnten ähnliche Phänomene eine Rolle spielen. Er wird durch Neurotransmitter und Anstieg beziehungsweise Abfall des extra- und intrazellulären pH-Wertes in seinen elektrophysiologischen Eigenschaften verändert (Gray 2000;

Karschin 2001). Zieht man diese Möglichkeit der posttranslationalen Aktivitätsregulierung in Betracht, besteht auch hier die Möglichkeit der konstanten Proteinexpression, aber einer unterschiedlichen Kanalaktivität, welche sich auf die Ionenströme auswirkt (Szabo et al. 1996; McCormack et al. 1999; Fadool et al. 2000; Gray 2000; Karschin 2001).

In der vorliegenden Arbeit zeigten die 1321N1-Zellen nach Markierung mit den von uns verwendeten Kaliumkanal-Antikörpern eine **Anfärbung zytoplasmatischer Strukturen**. Für Ionenkanäle als Membranproteine wurde ein eher membranassoziertes Fluoreszenzsignal erwartet. Sowohl für TASK als auch Kv1.3 existieren aber bereits veröffentlichte Arbeiten, welche den unseren Ergebnissen sehr ähnliche fluoreszenzmikroskopische Bilder präsentierten.

Kv1.3 zeigt in unseren Untersuchungen eine feingepunktete zytoplasmatische Fluoreszenz. Ähnliche Ergebnisse wurden an mikroglialen Zellen (Kotecha und Schlichter 1999; Küst et al. 1999) und einer Neuroblastom-Gliom-Hybrid-Zelllinie (Ma et al. 1999) gefunden. Immunzytochemische Analysen an Rattenmikroglia zeigten einen weiteren interessanten Befund: Diese Zellen hatten im ruhenden, nicht proliferativen Zustand in vitro eine den unseren Ergebnissen entsprechende zytoplasmatische Fluoreszenz nach Markierung mit Anti-Kv1.3-Antikörpern und in elektrophysiologischen Analysen kaum entsprechende, durch Kv1.3 verursachte Ströme. Erst nach einigen Tagen in Kultur stieg mit zunehmender Proliferation und messbarer elektrophysiologischer Aktivität von Kv1.3 die Immunreaktivität der Zellen für Kv1.3 noch etwas an und die zytoplasmatisch betonte Fluoreszenz wandelte sich in eine membranassozierte Markierung (Kotecha und Schlichter 1999). Auf unsere Ergebnisse an 1321N1-Zellen übertragen würde sich folgendes ergeben: Kv1.3 wird in 1321N1-Zellen exprimiert. Ein Großteil dieser Kanalproteine ist aber wahrscheinlich in zytoplasmatischen Organellen gespeichert.

Die fleckförmige diffuse Markierung von 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation mit Anti-TASK-Antikörpern beinhaltet durchaus die Möglichkeit einer unspezifischen Reaktion. Da jedoch mit dem von uns verwendeten Antikörper die von Millar et al. (2000) beschriebene Abhängigkeit der TASK-Expression von der Zeit in Kultur in cerebellären Körnerzellkulturen nachvollzogen werden konnte (siehe Kapitel 4.5.2), ist die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Markierung in unseren Versuchen auch ohne durchgeführten Western-Blot sehr gering.

Zusammenfassend zeigen die von uns erhobenen Daten eine konstante Expression von Kv1.3 und TASK in 1321N1-Zellen unter Serumdeprivation ohne und mit NGF an. Es ist mit den verwendeten Methoden ein Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und den Parametern Proliferation und Apoptose nicht ohne weiteres erkennbar.

5.3 Bedeutung der Ergebnisse

5.3.1 Besitzen endogen produzierte Wachstumsfaktoren eine Relevanz für wichtige tumorbiologische Parameter in Gliomzellen?

Durch die vorliegende Arbeit konnten Zeichen einer beginnenden Differenzierung der Astrozytomzelllinie 1321N1 unter autokriner Stimulation durch Serumentzug gefunden werden. Das zeigt die Wichtigkeit endogen produzierter Wachstumsfaktoren für tumorbiologische Vorgänge. Der gleichzeitig beobachtete Proliferationsrückgang weist darauf hin, dass 1321N1-Zellen durch Wachstumsfaktoren in einen Zustand gebracht werden können, welcher denen ausdifferenzierter, reifer, nicht maligner Zellen ähnlicher ist und weniger Merkmale transformierter Zellen besitzt. Zwar wurde die Apoptoserate nicht drastisch gesteigert, es zeichnete sich aber in Form der Zelldifferenzierung bei den 1321N1-Zellen ein tumorbiologisch günstiger Effekt der endogen produzierten Wachstumsfaktoren ab. Eine Steigerung dieser Effekte konnte durch Zugabe von NGF allerdings nicht erreicht werden. Trotzdem ist anzunehmen, dass endogen produziertes NGF eine autokrine Wirkung auf die Tumorzellen ausübt. Hinweise darauf ergeben sich aus der Korrelation der morphologiebezogenen Proliferations- und Apoptoseraten mit der Expression des p75-Rezeptors. Es muss allerdings erwähnt werden, dass p75 nicht nur NGF, sondern alle bekannten Neurotrophine mit niedriger Affinität binden kann (Chao und Hempstead 1995; Bibel und Barde 2000).

Bereits frühere Untersuchungen legten nahe, dass neurotrophe Faktoren und insbesondere NGF eine Rolle bei der autokrinen Regulation von Gliomen und den von ihnen abgeleiteten Kulturen spielen (Tajima et al. 1998; Watanabe et al. 1999; Weis et al. 1999). So fanden Watanabe et al. (1999) an der C6-Rattengliomzelllinie sehr deutliche Hinweise auf eine autokrine NGF-Wirkung. Durch Zugabe von Anti-NGF-Antikörpern wurde das in der Kultur produzierte NGF inaktiviert und dadurch folgende Veränderungen an den Gliomzellen herbeiführt: Es kam zu einem starken und schnellen Rückgang der Zellzahl mit Zellatrophie und Dilatation der Fortsätze. Die Zahl

der NGF-Rezeptor-positiven Zellen sank von 80% auf unter 10%. Wurde zu dem endogen produzierten hingegen zusätzliches NGF zugegeben, konnte eine dosisabhängige Proliferationshemmung und morphologisch erkennbare, zu unseren Versuchen ähnliche, Differenzierung festgestellt werden. Dies bedeutet, dass auf der einen Seite die Unterbrechung dieses autokrinen Regulationskreises zum Zusammenbrechen der Zellkultur führte, auf der anderen Seite durch weitere Stimulierung der Zellen die Proliferation ebenfalls gehemmt wurde. Es zeigt sich, wie äußerst komplex die Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und den von ihnen produzierten Wachstumsfaktoren sind. Durch unsere und ähnliche Untersuchungen kann das Wissen über derartige Regulationsmechanismen verbessert werden. So können neue und effektive Wege zur Beeinflussung des Gliomzellwachstums in vitro gefunden werden.

5.3.2 Lassen sich die in vitro gewonnen Erkenntnisse auf die Situation in vivo übertragen?

Da das Ziel der Tumorforschung die Steuerung von Malignomgewebe in vivo ist, stellt sich die Frage, ob sich der in unseren Versuchen induzierte Proliferationsrückgang der Zellen in Kultur auf die Situation im Organismus übertragen lässt. Hierzu existieren bereits mehrere Arbeiten: Die oft zitierten C6-Rattengliomzellen konnten in Kultur durch trkA-Transfektion und NGF-Gabe zur Ausdifferenzierung gebracht werden (Colangelo et al. 1994). Implantierte man diese trkA-exprimierenden Gliomzellen in Rattenhirne, war das Wachstum der gebildeten Tumoren gegenüber Tumoren, die aus nicht trkA-transfizierten Zellen stammten, deutlich reduziert (Rabin et al. 1998). Der auf der endogenen NGF-Produktion basierende Proliferationsrückgang nach trkA-Transfektion konnte also auch in vivo beobachtet werden. Ebenso wurden mittels Immunhistochemie an Gewebsschnitten Hinweise auf einen Einfluss von NGF / trkA auf die Differenzierung von Gliomzellen gefunden (Tajima et al. 1998). Diese Arbeit zeigte eine häufige Koexpression von NGF, trkA und GFAP. Dies kann als Zeichen der Differenzierungsinduktion durch ein auto- bzw. parakrin wirkendes NGF-trkA-System gewertet werden. In vitro wichtige Wachstumsfaktoren spielen demnach auch in vivo eine Rolle.

Natürlich besteht auch die Möglichkeit der Wachstumsfaktorapplikation im Organismus. Auf diese Weise konnten Vinores und Köstner (1980) durch NGF-Applikation die Überlebenszeit von Ratten, denen zuvor Zellen der anaplastischen Gliomzelllinie F98 implantiert wurden, deutlich verlängern. Dabei wurde weiterhin

festgestellt, dass auf eine derartige Wachstumsfaktorthherapie gut differenzierte Gliome nicht reagierten.

5.3.3 Ist die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf alle Gliome gleich?

Nun stellt sich die Frage, ob alle, und wenn nicht, welche Gliome durch eine NGF-Applikation günstig zu beeinflussen sind und wie sie von resistenten Tumoren unterschieden werden können. Vielleicht bietet die immunhistochemische Analyse der NGF-Rezeptoren einen Anhaltspunkt. Da in unseren Untersuchungen nur mit einer Zelllinie gearbeitet wurde, können wir zur Klärung dieser Frage nicht wesentlich beitragen. Ein interessantes Merkmal NGF-sensibler Tumoren fanden Viores und Köstner (1980). Hier wurde die durch NGF verursachte, kurz andauernde Proliferationssenkung nur bei sehr undifferenzierten Gliomen gefunden. Andere Arbeiten konnten keinen Zusammenhang zwischen Proliferation beziehungsweise Malignität und Neurotrophinrezeptorexpression finden (Prior et al. 1989; Hamel et al. 1993).

Die hier vorgelegten Daten zeigen eine ungleichmäßige Reaktion der 1321N1-Zellen auf die autokrine Stimulation an. Es wurde bereits auf die Korrelation der p75-Expression mit der Proliferation und dem Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen hingewiesen. Anzeichen für derartige Verhältnisse wurden schon bei anderen Gliomzellkulturen gefunden und begründen sich vielleicht in der von uns und anderen beschriebenen Variabilität der Neurotrophinrezeptorexpression unter den einzelnen Zellen (Viores und Köstner 1980). So reagierte in unseren Experimenten die Morphologiegruppe mit der höchsten p75-Rezeptorexpression am deutlichsten auf die Serumdeprivation. Im Extremfall könnte ein Teil der Tumorzellen völlig NGF-resistent sein. Dann würde eine Wachstumsfaktorbehandlung nur durch einen sehr kurzfristigen Erfolg gekennzeichnet sein und zur Selektion resistenter Zellklone beitragen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bisher keine prognostischen Parameter erkennbar sind, welche die Wirkung von NGF auf Gliomzellen sicher vorhersehen lassen.

5.4 Schlussfolgerungen

Durch die vorliegende Arbeit konnten bei der Astrozytomzelllinie 1321N1 unter autokriner Stimulation durch Serumentzug neben einer reduzierten Proliferation Anzeichen einer Differenzierung gefunden werden. Die morphologischen Veränderungen

(runde Zellkörper, Entstehen von Zellfortsätzen) wurden in Verbindung mit elektrophysiologischen Befunden früherer Arbeiten an derselben Zelllinie als Indiz für eine neuronenähnliche Differenzierung angesehen. Es fanden sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Morphologie, niedriger Proliferationsrate, Apoptoseinduktion und Expression des NGF-Rezeptors p75: Die Gruppe der runden Zellen zeigte den größten Anteil p75-positiver Zellen, gleichzeitig die niedrigste Proliferationsrate und den höchsten Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen. Dies ist eine für ein aktives p75 / NGF-System typische Konstellation. Allerdings hatte die zusätzliche Gabe von NGF keinen erkennbaren Einfluss auf die auch allein durch Serumentzug induzierten Veränderungen. Bei den anderen untersuchten Parametern (trkA-Expression, Kaliumkanal-Expression) fanden sich keine Korrelationen mit der Zellmorphologie.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit die Relevanz endogen produzierter Wachstumsfaktoren im Rahmen auto- bzw. parakriner Regulationsmechanismen in der humanen 1321N1-Astrozytomzellkultur unterstrichen werden. Die zellbiologischen Parameter Zellmorphologie, Proliferation und Apoptose werden durch solche Regulationskreise wahrscheinlich entscheidend beeinflusst.

In der Tumorforschung gibt es Ansätze, sich diesen Zusammenhang zunutze zu machen, indem man versucht, über die Modulation von Zelleigenschaften maligne, proliferativ hochaktive Tumorzellen via Ausdifferenzierung zur Wachstumsstagnation zu bringen. Unsere Arbeit zeigt, dass dieser Ansatz bei Gliomzellen in vitro durchaus erfolgversprechend ist. Allerdings zeigt unsere Arbeit auch – zusammen mit den heterogenen Befunden aus der Literatur –, dass der Zelldifferenzierung mehrere verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, diese in unterschiedlichem Maße und milieuhabhängig greifen und in vivo gegenüber denen, die in vitro identifizierbar sind, nicht identisch sein müssen. Insofern bleibt die Aufgabe bestehen, nach Wegen der Tumorzellmodulation zu suchen, welche in vivo verlässlich anwendbar sind.

6 Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren beeinflussen die verschiedensten zellbiologischen Prozesse mit zum Teil entgegengesetzten Wirkungen. Beides, Wachstumsförderung und Proliferationshemmung sind beschrieben worden. In Tumorzellkulturen können diese Faktoren von den Zellen selbst produziert oder von exogen zugeführt werden. Wirken die endogen produzierten Wachstumsfaktoren auf die Tumorzellen selbst, spricht man von autokrinen Regulationskreisen. Solche Mechanismen treffen auch für Gliomzellkulturen zu. Durch vorangegangene elektrophysiologische Untersuchungen (Kraft et al. 2001) konnte eine differenzierungs-induzierende Wirkung von endogen produzierten Wachstumsfaktoren und exogen zugeführtem NGF in zwei humanen Gliomzelllinien (1321N1 und A172) nachgewiesen werden. Dabei fand sich eine erhöhte Dichte an spannungsabhängigen Natriumkanälen, welche als neuronenhähnliche Differenzierung ausgelegt wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Phänomen an der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 durch kombinierte morphologische und immunzytologische Methoden näher aufzuklären.

1321N1-Zellen wurden zur autokrinen Stimulation in serumfreiem Medium kultiviert. Um über isolierte NGF-Wirkungen Auskunft geben zu können, wurden parallel Versuche in serumfreiem Medium ohne und mit NGF durchgeführt. Die Zellen wurden 0, 2, 6, 9 bzw. 13 Tage unter Serumdeprivation kultiviert, anschließend fixiert, immunzytologisch gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden alle Zellen in drei Morphologiegruppen unterteilt (runde Zellen, fibroblastenähnliche Zellen ohne Fortsätze, fibroblastenähnliche Zellen mit Fortsätzen). Der Anteil jeder Morphologiegruppe an der Gesamtzahl aller Zellen wurde an den oben genannten Tagen ermittelt. Um den möglichen Zusammenhang zwischen Morphologie und anderen zellbiologischen Parametern zu untersuchen, wurden für jede Gruppe folgende Marker getrennt erfasst: die Wachstumsfraktion (mittels Anti-Ki67-Antikörpern), die Expression der NGF-Rezeptoren *trkA* und *p75* (als Hinweis auf eine mögliche NGF-Sensibilität der Zellen), die Expression der Kaliumkanäle *Kv1.3* und *TASK* (Parameter mit Bezug zur Zelldifferenzierung und -proliferation), die DNA-Fragmentation bzw. Apoptose (mittels der TUNEL-Methode [terminal deoxyuridine transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end labeling method]).

In den ersten sechs Tagen unter Serumentzug ließ sich ein Anstieg der Zellen mit Fortsätzen und ein deutlicher Proliferationsrückgang feststellen. In Verbindung mit den elektrophysiologischen Befunden aus der Arbeit von Kraft et al. (2001) an der gleichen Zelllinie werteten wir dies als ein Indiz für einen neuronenhähnlichen Differenzierungsprozess.

Sowohl vor (Tag 0) als auch während der Kultivierung (Tage 2, 6, 9, 13) in serumfreiem Medium zeigte sich in allen Zellen eine konstante Expression des trkA-Rezeptors und der Kaliumkanäle Kv1.3 und TASK. Im Gegensatz hierzu zeigte nur ein Teil der Zellen ein positives Signal nach Anti-p75-Markierung. Dieser Prozentsatz variierte während der Zeit unter Serumdeprivation. Die runden Zellen besaßen die höchste relative Häufigkeit p75-positiver Zellen ($p < 0,05$) und wiesen gleichzeitig die niedrigste Proliferationsrate sowie den höchsten Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen auf.

Unsere Studie wies einen Zusammenhang zwischen Zellmorphologie, p75-Expression, Proliferationsrate und dem Anteil TUNEL-positiver Zellen nach. Dies deutet darauf hin, dass bei 1321N1-Zellen der p75-Rezeptor und dessen Ligand NGF in autokrinen Regulationskreisen eine Bedeutung haben. Die exogene Zufuhr von NGF hatte allerdings keine zusätzlichen Wirkungen.

Die konstante Expression für trkA, Kv1.3 und TASK interpretierten wir am ehesten als Anhaltspunkt dafür, dass diese Proteine zum konstitutiven Expressionsmuster der 1321N1-Zellen gehören.

Die Ergebnisse weisen auf die Bedeutung autokriner Regulationsmechanismen in der humanen 1321N1-Astrozytomzelllinie hin. Sie ergeben Hinweise auf die Beeinflussung der Proliferation, Apoptose, Morphologie dieser Zellen durch Wachstumsfaktoren, insbesondere NGF und dessen Rezeptor p75.

Andere Arbeiten beschreiben, wie man sich diese Beeinflussung in der Tumorforschung zunutze machen kann. Über die Modulation von Zelleigenschaften konnten maligne, proliferativ hochaktive Tumorzellen via Ausdifferenzierung zur Wachstumsstagnation gebracht werden. Unsere Arbeit zeigt, dass dieser Ansatz auch bei Gliomzellen erfolgversprechend ist. Allerdings müssen die zugrundeliegenden Mechanismen weiter abgeklärt werden. Unsere in vitro-Ergebnisse ermutigen dazu, nach Wegen der Tumorzellmodulation zu suchen, welche in vivo verlässlich anwendbar sind.

7 Literaturverzeichnis

Akhtar S, McIntosh P, Bryan-Sisneros A, Barratt L, Robertson B and Dolly JO (1999) A functional spliced-variant of $\beta 2$ subunit of Kv1 channels in C6 glioma cells and reactive astrocytes from rat lesioned cerebellum. *Biochem* 38:16984-16992

Alkiza K, Adan B, Garibi JM and Lafuente JV (2000) The evaluation of cell proliferation in gliomas. *Rev Neurol* 30:141-146

Allen DH, Lepple-Wienhues A and Cahalan MD (1997) Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membrane Biol* 155:27-34

Arcangeli A, Rosati B, Cherubini A, Crociani O, Fontana L, Passani B, Wanke E and Olivotto M (1998) Long-term exposure to retinoic acid induces the expression of IRK1 channels in HERG channel-endowed neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* 244:706-711

Arcangeli A, Rosati B, Crociani O, Cherubini A, Fontana L, Passani B, Wanke E and Olivotto M (1999) Modulation of HERG current and herg gene expression during retinoic acid treatment of human neuroblastoma cells: potentiating effects of BDNF. *J Neurobiol* 40:215-225

Arrighi I, Lesage F, Scimeca JC, Carle GF and Barhanin J (1998) Structure, chromosome localization, and tissue distribution of the mouse TWIK K^+ channel gene. *FEBS* 425:310-316

Attali B, Wang N, Kolot A, Sobko A, Cherepanov V and Soliven B (1997) Characterization of delayed rectifier Kv channels in oligodendrocytes and progenitor cells. *J Neurosci* 17:8234-8245

Baltuch GH and Yong VW (1996) Signal transduktion for proliferation of glioma cells in vitro occurs predominantly through a protein kinase C-mediated pathway. *Brain Res* 710:143-149

Barbacid M (1994) The trk Family of Neurotrophin Receptors. *J Neurobiol* 25:1386-1403

Barker PA (1998) P75-NTR: a study in contrasts. *Cell Death Differ* 5:346-356

Barres BA, Koroshetz WJ, Chun LL and Corey DP (1990a) Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* 5:527-544

Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LL and Corey DP (1990b) Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4:507-524

Barrett GL and Georgiou A (1996) The low-affinity nerve growth factor receptor p75NGFR mediates death of PC12 cells after nerve growth factor withdrawal. *J Neurosci Res* 45:117-128

Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Taglialatela M, Morra F, Castaldo P, Crociani O, Rosati B, Faravelli L, Olivetto M and Wanke E (1998) HERG encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells. *Cancer Res* 58:815-822

Bibel M and Barde Y-A (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes and Development* 14:2919-2937

Bibel M, Hoppe E and Barde Y-A (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO* 18:616-622

Bogenmann E, Peterson S, Maekawa K and Matsushima H (1998) Regulation of NGF responsiveness in human neuroblastoma. *Oncogene* 17:2367-2376

Bordey A and Sontheimer H (1997) Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol* 78:461-477

Bordey A and Sontheimer H (1998a) Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells in situ: enigma of spiking glial cells. *J Neurophysiol* 79:2782-2793

Bordey A and Sontheimer H (1998b) Passive glial cells, fact or artifact? *J Membrane Biol* 166:213-222

Bordey A and Sontheimer H (2000) Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30:27-38

Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18:223-253

Bredesen DE and Rabizadeh S (1997) P75^{NTR} and apoptosis: trk-dependent and trk-independent effects. *TINS* 20:287-290

Bredesen DE, Ye X, Tasinato A, Sperandio S, Wang JLL, Assa-Munt N and Rabizadeh S (1998) P75-NTR and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. *Cell Death Differ* 5:365-371

Brismar T (1995) Physiology of transformed glial cells. *Glia* 15:231-243

Brockhaus J and Deitmer JW (2000) Developmental downregulation of ATP-sensitive potassium conductance in astrocytes in situ. *Glia* 32:205-213

Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT and Chao MV (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383:716-719

Chandler CE, Parsons LM, Hosang M and Shooter ME (1984) A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J Biol Chem* 259:6882-6889

Chao MV (1992) Neurotrophin Receptors: A window into neuronal differentiation. *Neuron* 9:583-593

Chao MV and Hempstead BL (1995) P75 and trk: a two-receptor system. *TINS* 18:321-326

Cheng K, Sawamura Y, Sakuma S, Tada M, Sudo M, Aida T and Abe H (1994) Antiproliferative effect of tumor necrosis factor- α on human glioblastoma cells linked with cell cycle arrest in G1 phase. *Neurol Med Chir* 34:274-278

Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivotto M and Arcangeli A (2000) HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* 83:1722-1729

Chin LS, Park CC, Zitnay KM, Sinha M, Di Patri AJ Jr, Perillan P and Simard JM (1997) 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K⁺ Channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurosci Res* 48:122-127

Chiu SY and Wilson GF (1989) The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. *J Physiol* 408:199-222

Chung I and Schlichter LC (1997) Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C. *J Membrane Biol* 156:73-85

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz-de-Miera E and Rudy B (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann NY Acad Sci* 868:233-285

Colangelo AM, Fink DW, Rabin SJ and Mocchetti I (1994) Induction of nerve growth factor responsiveness in C6-2B glioma cells by expression of trkA proto-oncogene. *Glia* 12:117-127

Coleman SK, Newcombe J, Pryke J and Dolly JO (1999) Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *J Neurochem* 73:849-858

Coulson EJ, Reid K, Baca M, Shipham KA, Hulett SM, Kilpatrick TJ and Bartlett PF (2000) Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J Biol Chem* 275:30537-30545

Cowan MW, Jessell TM and Zipursky LS (1997) Molecular and cellular approaches to neural development. Oxford Uni Press 221-265

DeCoursey TE, Kim SY, Silver MR and Quandt FN (1996) Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *J Membrane Biol* 152:141-157

DeFreitas MF, McQuillen PS and Shatz CJ (2001) A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci* 21:5121-5129

Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV and Hannun YA (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low affinity neurotrophin receptor. *Science* 265:1596-1599

Dolly JO and Parcej DN (1996) Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. *J Bioenergetics Biomembranes* 28:231-253

Dubois J-M and Rouzaine-Dubois B (1993) Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 59:1-21

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C and Lazdunski M (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO* 16:5464-5471

Emmet CJ, McNeeley PA and Johnson RM (1997) Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nerve growth factor release. *Neurochem Int* 30:465-474

Emmi A, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Taglialatela M, Castaldo P, Bianchi L, Nerbonne J, Robertson GA and Janigro D (2000) Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 20:3915-3925

Engelbraaten O, Bjerkvig R, Pedersen PH and Laerum OD (1993) Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF(bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumor biopsies in vitro. *Int J Cancer* 53:209-214

Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ and Simmen JA (2000) Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83:2332-2348

Frade JM, Rodriguez-Tebar A and Barde YA (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168

Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA-fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501

Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E and Flad HD (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen. This is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138:867-873

Gill JS, Schenone AE, Podratz JL and Windebank AJ (1998) Autocrine regulation of neurite outgrowth from PC12 cells by nerve growth factor. *Mol Brain Res* 57:123-131

Gnatenco C, Han J, Snyder AK and Kim D (2002) Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res* 931:56-67

Gray AT (2000) New diversity within the mammalian tandem pore domain K⁺ channel family. *Modulator* 13:5-7

Greene LA and Kaplan DR (1995) Early events in neurotrophin signalling via trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5:579-587

Greene LA and Tischler AS (1982) PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research. *Adv Cell Neurobiol* 3:373-414

Greene LA and Tischler AS (1976) Establishment of noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2424-2428

Grimes ML, Beattie E and Mobley WC (1997) A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, trkA. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9909-9914

Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall D E, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW and Mobley WC (1996) Endocytosis of activated trkA: Evidence that Nerve Growth Factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16:7950-7964

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD and Chandy G (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45:1227-1234

Hamburger V (1993) The history of the discovery of the nerve growth factor. *J Neurobiol* 24:893-897

Hamel W, Westphal M, Szonyi E, Escandon E and Nikolics K (1993) Neurotrophin gene expression by cell lines derived from human gliomas. *J Neurosci Res* 34:147-157

Helms LMH, Felix JP, Bugianesi RM, Garcia ML, Stevens S, Leonard RJ, Knaus H-G, Koch R, Wanner SG, Kaczorowski GJ and Slaughter RS (1997) Margatoxin binds to a homomultimer of Kv1.3 channels in jurkat cells Comparison with Kv1.3 expressed in CHO cells. *Biochemistry* 36:3737-3744

Holmes TC, Fadool DA and Levitan IB (1996) Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel. *J Neurosci* 16:1581-1590

Hutton LA, de Vellis J and Perez Polo JR (1992) Expression of p75NGFR, trkA and trkB mRNA in rat C6 glioma and type 1 astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 32:375-383

Hutton LA and Perez Polo JR (1995) In vitro glial responses to nerve growth factor. J Neurosci Res 41:185-196

Ishiuchi S, Nakazato Y, Iino M, Ozawa S, Tamura M and Ohye C (1998) In vitro neuronal and glial production and differentiation of human central neurocytoma cells. J Neurosci Res 51:526-535

Jensen SB, Odum N, Koschmieder Jorgensen N, Christophersen P and Olsen S-P (1999) Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. Proc Natl Acad Sci USA 96:10917-10921

Jou I, Pyo H, Chung S, Jung SY, Gwag BJ and Joe E-H (1998) Expression of Kv1.5 K^{+} channels in activated microglia in vivo. Glia 24:408-414

Kaplan DR and Miller FD (1997) Signal transduction by the neurotrophin receptors. Curr Biol 9:213-221

Karschin A (2001) K^{+} Kanäle mit zwei Porendomänen: funktionelle Bedeutung einer neuen Proteinfamilie im Nervensystem. Neuroforum 3:82-92

Kato T, Sawamura Y, Tada M, Sakuma S, Sudo M and Abe H (1995) P55 and p75 tumor necrosis factor receptor expression on human glioblastoma cells. Neurol Med Chir 35:567-574

Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK and Schlichter LC (1999) hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K_{Ca} channel in human T lymphocytes. J Biol Chem 274:14838-14849

Khursigara G, Bertin J and Yano H (2001) A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the Caspase Recruitment Domain Receptor Interacting Protein 2. J Neurosci 21:5885-5886

Kim D, Fujita A, Horio Y and Kurachi Y (1998) Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K^{+} channel (cTBAK-1). Circ Res 82:513-518

Knupfer H and Arendt T (2001) NGF increases cell survival rates under serum deprived conditions. *Anticancer Res* 21:2797-2802

Kokunai T, Iguchi H and Tamaki N (1999) Differentiation and growth inhibition of glioma cells by transfer of trkA proto-oncogene. *J Neuro-Oncol* 42:23-34

Koller H, Allert N, Oel D, Stoll G and Siebler M (1998) TNF- α induces a protein kinase C-dependent reduction in astroglial K⁺ conductance. *J Neurosci* 17:2669-2682

Konishi T (1989) Voltage-dependent potassium channels in mouse schwann cells. *J Physiol* 411:115-130

Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13:2739-2748

Kotecha SA and Schlichter LC (1999) A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *J Neurosci* 19:10680-10693

Kraft R, Basrai D, Benndorf K and Patt S (2001) Serum deprivation and NGF induce and modulate voltage-gated Na currents in human astrocytoma cell lines. *Glia* 34:59-67

Krüttgen A, Möller C, Heymach JV Jr and Shooter EM (1998) Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9614-9619

Kumano T, Mutoh T, Nakagawa H and Kuriyama (2000) HMG-CoA reductase inhibitor induces a transient activation of high affinity nerve growth factor receptor, trk, and morphological differentiation with fatal outcome in PC12 cells. *Brain Res* 859:169-172

Kumar S, Huber J, Pena LA, Perez-Polo JR, Werrbach-Perez K and DeVellis J (1990) Characterization of functional nerve growth factor-receptors in a CNS glial cell line: monoclonal antibody 217c recognizes the nerve growth factor-receptor on C6 glioma cells. *J Neurosci Res* 27:408-417

Küst BM, Biber K, van Calcar D and Gebicke-Haerter PJ (1999) Regulation of K⁺ channel mRNA expression by stimulation of adenosine A2a-receptors in cultured rat microglia. *Glia* 25:120-130

Lachyankar MB, Ross AH, Litofsky NS, Condon PJ, Quesenberry PJ and Recht LD (1997) trkA expression decreases the in vivo aggressiveness of C6 glioma cells. *Cancer Res* 57:532-536

Lee P-G and Koo PH (1999) Rat α 2-macroglobulin inhibits NGF-promoted neurite outgrowth, trk phosphorylation, and gene expression of pheochromocytoma PC12 cells. *J Neurosci Res* 57:872-883

Levitan ES and Takimoto K (1998) Dynamic regulation of K⁺ channel gene expression in differentiated cells. *J Neurobiol* 37:60-68

Levite BM, Cahalon L, Peretz A, HersHKoviz R, Sobko A, Ariel A, Desai R, Attali B and Lider O (2000) Extracellular K⁺ and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and β 1 integrins. *J Exp Med* 191:1167-1176

Li L, Head V and Timpe LC (2001) Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia* 33:57-71

Liepinsh E, Ilag LL, Otting G and Ibanez CF (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO* 16:4999-5005

Lombardi V, De Gregorio G, Porcellini A, Calogero A, Arcella A, Frati L and Ragona G (2002) Isolation of a glioblastoma cell line showing pluripotent phenotypic features. *Glia* 38:30

Lopes CMB, Gallagher PG, Buck ME, Butler MH and Goldstein SAN (2000) Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3. *J Biol Chem* 275:16969-16978

Lu B, Yokoyama M, Dreyfus CF and Black IB (1991) NGF gene expression in actively growing brain glia. *J Neurosci* 11:318-326

Ma W, Grant GM, Pancrazio JJ, Kao WY, Shaffer KM, Liu Q-Y, Barker JL, Cohen NA and Stenger DA (1999) Kir 4.1 channel expression in neuroblastoma*glioma hybrid NG108-15 cell line. *Dev Brain Res* 114:127-134

Ma W, Zhang L, Xing G, Hu Z, Iwasa KH and Clay JR (1998) Prenatal expression of inwardly rectifying potassium channel mRNA (Kir4.1) in rat brain. *Neuroreport* 26:223-227

MacFarlane SN and Sontheimer H (1997) Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *J Neurosci* 17:316-329

MacFarlane SN and Sontheimer H (2000a) Modulation of Kv1.5 currents by src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J Neurosci* 20:5245-5253

MacFarlane SN and Sontheimer H (2000b) Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* 30:39-48

MacPhee IJ and Barker PA (1997) Brain-derived Neurotrophic Factor Binding to the p75 Neurotrophin Receptor reduces trkA signaling while increasing serine phosphorylation in the trkA intracellular domain. *J Biol Chem* 272:23547-23551

Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M and Honore E (1999) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem* 274:1381-1387

Marushige Y, Marushige K and Koestner A (1992) Growth inhibition of anaplastic glioma cells by nerve growth factor. *Anticancer Res* 12:2069-2073

Marushige Y, Raju NR, Marushige K and Koestner A (1987) Modulation of growth and of morphological characteristics in glioma cells by nerve growth factor and glia maturation factor. *Cancer Res* 47:4109-4115

Matsushima H and Bogenmann E (1993) Expression of trkA cDNA in neuroblastomas mediates differentiation in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 13:7447-7456

McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A and Rudy B (1999) The effects of shaker β -subunits on the human lymphocyte K^+ channel Kv1.3. *J Biol Chem* 274:20123-20126

McKhann GM 2nd, Dámbrósio R and Janigro D (1997) Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes. *J Neurosci* 17:6850-6863

Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Krüttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MGJr, Reichardt LF and Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit trkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693

Millar JA, Barratt L, Southan AP, Page KM, Fyffe REW, Robertson B and Mathie A (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *PNAS* 97:3614-3618

Miller C (1991) Annus mirabilis of potassium channels. *Science* 252:1092-1096

Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ and Lee VM-Y (1997) Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express trkA receptors. *J Neurosci* 17:530-542

Murphy RA, Oger J, Saide JD, Blanchard MH, Arnason BG, Hogan C and Pantazis NJ (1977) Secretion of nerve growth factor by central nervous system glioma cells in culture. *J Cell Biol* 72:769-773

Newcomb JK, Zhao X, Pike BR and Hayes RL (1999) Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. *Exp Neurology* 158:76-88

Newman EA, Kettenman Hand Ransom BR (1995) Glial cell regulation of extracellular potassium. *Neuroglia* 717-713

Nilius B and Droogmans G (1994) A role for K channels in cell proliferation. *NIPS* 9:105-110

Obara Y, Nakahata N, Kita T, Takaya Y, Kobayashi H, Hosoi S, Kiuchi F, Ohta T, Oshima Y and Ohizumi Y (1999a) Stimulation of neurotrophic factor secretion from 1321N1 human astrocytoma cells by novel diterpenoids, scabronines A and G. *European J Pharmacol* 370:79-84

Obara Y, Takahashi M, Nakahata N and Ohizumi Y (1999b) Maitotoxin-induced nerve growth factor production accompanied by the activation of a voltage-insensitive Ca^{2+} channel in C6-BU-1 glioma cells. *Br J Pharmacol* 127:1577-15782

Obara Y, Nakahata N and Ohizumi Y (1998) A new factor derived from 1321N1 human astrocytoma cells causes differentiation of PC-12 cells mediated through mitogen-activated protein kinase cascade. *Brain Res* 806:79-88

Oelmann E, Sreter L, Schnuller I, Serve H, Koenigsmann M, Wiedenmann B, Oberberg D, Reufi B, Thiel E and Berdel WE (1995) Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling. *Cancer Res* 55:2212-2219

Oh Y (1997) Ion channels in neuroglial cells. *Kaohsiung J Med Sci* 13:1-9

Pappas CA and Ritchie JM (1998) Effect of specific ion channel blockers on cultured schwann cell proliferation. *Glia* 22:113-120

Pardo LA, delCamino D, Sanchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S and Stühmer W (1999) Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO* 18:5540-5547

Patt S, Labrakakis C, Bernstein M, Weydt P, Cervos-Navarro J, Nisch G and Kettenmann H (1996) Neuron-like physiological properties of cells from human oligodendroglial tumors. *Neurosci* 71:601-611

Perillan PR, Li X and Simard JM (1999) K⁺ inward rectifier currents in reactive astrocytes from adult rat brain. *Glia* 27:213-225

Pflug BR, Colangelo AM, Tornatore C and Mocchetti I (2001) TrkA induces differentiation but not apoptosis in C6-2B glioma cells. *J Neurosci Res* 64:636-645

Phung YT, Bekker JM, Hallmark OG and Black SM (1999) Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation: a cGMP independent pathway. *Mol Brain Res* 64:165-178

Poluha W, Poluha DK and Ross AH (1995) TrkA neurogenic receptor regulates differentiation of neuroblastoma cells. *Oncogene* 10:185-189

Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ and Storm JF (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β subunits. *Ann NY Acad Sci* 868:344-359

Prior R, Reifenberger G and Wechsler W (1989) Nerve growth factor receptor in tumours of the human nervous system. *Path Res Pract* 185:332-338

Rabin SJ, Tornatore C, Baker-Cairns B, Spiga G and Mocchetti I (1998) TrkA receptors delay C6-2B glioma cell growth in rat striatum. *Mol Brain Res* 56:273-276

Rabizadeh S, Oh J, Zhong L-T, Yang J, Bitler CM, Butcher LL and Bredesen DE (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261:345-348

Rabizadeh S, Rabizadeh S, Ye X, Wang JJ and Bredesen DE (1999) Neurotrophin dependence mediated by p75NTR: contrast between rescue by BDNF and NGF. *Cell Death Differ* 6:1222-1227

Reifenberger G, Kasamo S, Tajika Y and Wechsler W (1991) Immunohistochemical detection of oncoproteins, growth factors, and receptors in tumors of the nervous system. *Brain Tumor Pathol* 8:227-230

Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N and Lazdunski M (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem* 273:30863-30869

Rink A, Fung K-M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Neugebauer E and McIntosh TK (1995) Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 247:1575-1583

Roßner S, Schliebs R, Härtig W, Perez-Polo JR and Bigl V (1997) Selective induction of c-Jun and NGF in reactive astrocytes after cholinergic degenerations in rat basal forebrain. *Neuroreport* 8:2199-2202

Rouzaire-Dubois B and Dubois JM (1998) K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol* 510:93-102

Rouzaire-Dubois B, Milandri JB, Bostel S and Dubois JM (2000) Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *Pflügers Arch* 440:881-888

Roy ML, Saal D, Perney T, Sontheimer H, Waxman SG and Kaczmarek LK (1996) Manipulation of the delayed rectifier Kv15 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia* 18:166-184

Rudge JS, Li Y, Pasnikowski EM, Mattsson K, Pan L, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Lindsay RM and Ip NY (1994) Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *European J Neurosci* 6:693-705

- Sakuma S, Sawamura Y, Tada M, Aida T, Abe H, Suzuki K and Taniguchi N (1993) Responses of human glioblastoma cells to human natural tumor necrosis factor- α : susceptibility, mechanism of resistance and cytokine production studies. *J Neuro-Oncol* 15:197-208
- Schlichter LC, Sakellaropoulos G, Ballyk B, Pennefather PS and Phipps DJ (1996) Properties of K⁺ and Cl⁻ channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. *Glia* 17:225-236
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD and Gerdes J (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123:513-522
- Schmidt K, Eulitz D, Veh RW, Kettenmann H and Kirchhoff F (1999) Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res* 843:145-160
- Singer HS, Hansen B, Martinie D and Karp CL (1999) Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its trkA receptors. *J Neuro-Oncol* 45:1-8
- Snider WD (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77:627-638
- Snider WD and Wright DE (1996) Neurotrophins cause a new sensation. *Neuron* 16:229-232
- Sobko A, Peretz A, Shirihai O, Etkin S, Cherepanova V, Dagan D and Attali B (1998) Heteromultimeric delayed-rectifier K⁺ channels in schwann cells: developmental expression and role in cell proliferation. *J Neurosci* 18:10398-10408
- Sontheimer H (1994) Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11:156-172

Spencer RH, Chandy KG and Gutman GA (1993) Immunological identification of the shaker-related Kv1.3 potassium channel protein in T and B lymphocytes, and detection of related proteins in flies and yeast. *Biochem Biophys Res Comm* 191:201-206

Spoerri PE, Romanello S, Petrelli L, Negro A, Dal Toso R, Leon A and Skaper SD (1992) Nerve growth factor (NGF) receptors in a central nervous system glial cell line: Upregulation by NGF and Brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 33:82-90

Szabo I, Gulbins E, Apfel H, Zhang X, Barth P, Busch AE, Schlottmann K, Pongs O and Lang F (1996) Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J Biol Chem* 271:20465-20469

Szabo I, Nilius B, Zhang X, Busch AE, Gulbins E, Suessbrich H and Lang F (1997) Inhibitory effects of oxidants on n-type K⁺ channels in T lymphocytes and xenopus oocytes. *Pflügers Arch* 433:626-632

Tajima Y, Molina RP, Rorke LB, Kaplan DR, Radeke M, Feinstein SC, Lee VM-Y and Trojanowski JQ (1998) Neurotrophins and neuronal versus glial differentiation in medulloblastomas and other pediatric brain tumors. *Acta Neuropathol* 95:325-332

Talley EM, Lei Q, Sirois JE and Douglas AB (2000) TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25:399-410

Tanaka S, Nagashima T and Hori T (1998) In vitro inhibition of binding of tumor necrosis factor (TNF)- α by monoclonal antibody to TNF receptor on glioma cell and monocyte. *Neurol Med Chir* 38:812-818

Tornatore C, Rabin S, Baker-Cairns B, Keir S and Mocchetti I (1997) Engraftment of C6-2B cells into the striatum of ACI nude rats as a tool for comparison of the in vitro and in vivo phenotype of a glioma cell line. *Cell Transplant* 6:317-326

Ullrich N, Bordey A, Gillespie GY and Sontheimer H (1998) Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas. *Neurosci* 83:1161-1173

Verdi JM, Birren SJ, Ibanez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV and Anderson DJ (1994) P75^{NTR} regulates trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 12:733-745

Verma KS, Border B and Joho RH (1997) Regional and cellular expression patterns of four K⁺ channel mRNAs in the adult rat brain. *Mol Brain Res* 46:54-62

Vinore S A and Köstner A (1980) The effect of nerve growth factor on undifferentiated glioma cells. *Cancer Letters* 10:309-318

von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M and Dechant G (2001) Complete ablation of the neurotrophin receptor p75^{NTR} causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci* 4:977-978

Wang JLL, Rabizadeh S, Tasinato A, Sperandio S, Ye X, Green M, Assa-Munt N, Spencer D and Bredesen DE (2000) Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75^{NTR}. *J Neurosci Res* 60:587-593

Wang Y, Hagel C, Hamel W, Müller S, Kluwe L and Westphal (1998) TrkA, B, C are commonly expressed in human astrocytes and astrocytic gliomas but not by human oligodendrocytes and oligodendroglioma. *Acta Neuropathol* 96:357-364

Washiyama K, Muragaki Y, Rorke LB, Lee VM-Y, Feinstein SC, Radeke MJ, Blumberg D, Kaplan DR and Trojanowski JQ (1996) Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. *Am J Pathol* 148:929-940

Watanabe T, Katayama Y, Kimura S and Yoshino A (1999) Control of proliferation and survival of C6 glioma cells with modification of the nerve growth factor autocrine system. *J Neuro-Oncol* 41:121-128

Weis J, Schonrock LM, Zuchner SL, Lie DC, Sure U, Schul C, Stogbauer F, Ringelstein EB and Halfter H (1999) CNTF and its receptor subunits in human gliomas. *J Neuro-Oncol* 44:243-253

Westphal M and Herrmann H-D (1989) Growth factor biology and oncogene activation in human gliomas and their implications for specific therapeutic concepts. *Neurosurgery* 25:681-693

Wonderlin WF and Strobl JS (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membrane Biol* 154:91-97

Wright DE and Snider WD (1996) Focal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in developing mouse limb bud. *Cell Tissue Res* 286:209-217

Yager J, Richards S, Hekmat-Scafe DS, Hurd DD, Sundaresan V, Caprette DR, Saxton WM, Carlson JR and Stern M (2001) Control of drosophila perineurial glial growth by interacting neurotransmitter-mediated signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10445-10450

Yamaguchi H, Ukita H, Murakami H, Chiba S, Oshima Y, Ogata A, Ikeda M, Matsumoto A, Satone A, Ide W, Hashimoto I and Kamata H (1998) Induction of apoptosis through NGF/p75NTR in human glioma cells treated with propentofylline. *NoTo Shinkei* 50:407-414

Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B and Chao MV (1998) Competitive signaling between trkA and p75 Nerve Growth Factor Receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18:3273-3281

8 Anhang

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Stephan Patt, ohne dessen umfassende Unterstützung diese Arbeit nicht zustandegekommen wäre. Ich bin ihm sehr verbunden für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei allen Problemen, die mit der Ausarbeitung dieser Dissertation im Zusammenhang standen.

Dr. Robert Kraft danke ich sehr für die Einführung in die experimentelle Tätigkeit. Zahlreiche anregende Diskussionen brachten mich in der praktischen Arbeit sehr voran. Seine Arbeit war richtungsweisend für meine Untersuchungen.

Große Anerkennung gilt auch Dipl.-Biol. Lutz Liebmann für die Bereitstellung der cerebellären Rattenkörnerzellkulturen. Diese waren sehr wichtig zur Validierung des von mir verwendeten Anti-TASK-Antikörpers.

Große Hilfe habe ich bei meiner Arbeit auch durch Frau Klusch erfahren. Ohne ihre engagierte Unterstützung in allen Fragen der Immunzytochemie wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Viel Unterstützung in allen Fragen der Zellkultur erfuhr ich durch Frau Raabe. Bei ihr und Frau Fäsecke bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre. Für die großzügige Bereitstellung der technischen Geräte und einige praktische Hinweise danke ich Dr. G. Neupert.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. K.J. Stiller und Dr. Michael Haas für die Fotos und Unterstützung in allen technischen Fragen.

Frau Dipl.-Math. A. Brandstädt gilt mein Dank für die zahlreichen Anregungen und Hinweise bei der statistischen Auswertung.

Jena im November 2002

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Stephan Patt, Dr. K.J. Stiller, Dr. Robert Kraft, Dipl.-Biol. Lutz Liebmann, Dr. Michael Haas und Frau Dipl.-Math. A. Brandstädt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20. November 2002

Tobias Becker

Lebenslauf

Tobias Becker

geboren am 13.05.1978 in Arnstadt

1984-1991	Polytechnische Oberschule in Marlishausen
1991-1996	Herder-Gymnasium in Arnstadt
Juni 1996	Abitur
seit Oktober 1996	Medizinstudium an der FSU-Jena
August 1998	Physikum
August 1999	Erstes Staatsexamen
seit Dezember 1999	Doktorarbeit am Institut für Pathologie (Neuropathologie) der FSU-Jena
September 2001	zweites Staatsexamen
August 2002	erstes PJ-Tertial im SRH-Klinikum Suhl (Innere Medizin)

Jena, den 20. November 2002

Tobias Becker